

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID



**SECRECION DE INSULINA EN ANIMALES SUBNUTRIDOS:
ESTUDIO *IN VIVO* E *IN VITRO***

Diciembre, 1995

María Angeles Martín Arribas

Director: Carmen Alvarez Escolá

Profesor Titular de E.U.

Vº Bº

Director: Ana Mª Pascual-Leone Pascual

Investigador del CSIC

Vº Bº

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Grupo de Endocrinología y Metabolismo Perinatal, en el Instituto de Bioquímica (Centro Mixto: F. Farmacia - C.S.I.C.), ubicado en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Ha sido realizado por María Angeles Martín Arribas y dirigido por la Dra. Carmen Alvarez Escolá y Ana María Pascual-Leone Pascual.

Deseo expresar mi agradecimiento al Profesor D. Manuel Ruiz Amil, Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia, así como a la Dra. Evangelina Palacios Alaiz, actual Directora del Instituto de Bioquímica, su acogida en el mismo.

A las Dras. Carmen Álvarez Escolá y Ana María Pascual-Leone Pascual, Directoras de esta Tesis, mi más sincera gratitud por su apoyo y confianza constante, así como por el entusiasmo puesto en la realización de este trabajo de investigación.

Expreso también mi agradecimiento al Dr. Bernard Portha, con el que mantenemos una Acción Integrada, por facilitarnos el uso de los aparatos necesarios para los estudios histológicos realizados en este trabajo.

A la Dra. Cristina Casals por la ayuda tan desinteresada que me ha prestado.

A mis compañeros del Grupo de Endocrinología y Metabolismo Perinatal: Sonia Ramos, Ana de la Puente, María Agote, Eva Rubio y, sobre todo, a Luis Goya mi reconocimiento por su colaboración y amistad.

También quiero agradecer a mis compañeros que ya dejaron el grupo: Cecilia Aláez y Francisco Rivero por su ayuda y colaboración y, sobre todo, a Judith Cacho por su continuo apoyo y su más sincera amistad.

Agradezco especialmente a mi compañero Fernando Escrivá su inestimable ayuda en la puesta a punto del método de "Western Blotting", así como su ayuda y amistad.

Finalmente, agradezco la colaboración de Fernando González y Mercedes López, personal técnico de nuestro grupo, así como la inestimable labor de Manuel Escobosa y Angel García en el animalario del Centro. Igualmente, quiero agradecer a Teresa Lupiani el haberme prestado siempre tanta ayuda y compañía en los muchos ratos que he pasado en su biblioteca.

A ANTONIO

A MIS PADRES

A RAQUEL, GEMMA Y CESAR

A MI SOBRINA RAQUEL

INDICE

1. INTRODUCCION	-12-
1.1. ESTRUCTURA ENDOCRINA DEL PANCREAS	-12-
1.1.1. Desarrollo de las células B	-14-
1.1.2. Crecimiento de las células de los islotes y factores implicados	-14-
1.2. FUNCION DE LAS CELULAS B	-17-
1.2.1. Secreción de insulina en respuesta a distintos estímulos.	-17-
1.3. SUBNUTRICION Y ACTIVIDAD DE LAS CELULAS B	-24-
1.3.1. Efecto sobre la funcionalidad de las células B	-26-
1.3.2. Efecto sobre la estructura y desarrollo de las células B.	-27-
1.4 DIABETES Y MALNUTRICION	-29-
1.5. PLANTEAMIENTO Y CONCLUSIONES GLOBALES DEL TEMA	-32-
2. MATERIAL Y METODOS	-36-
2.1. ANIMALES	-36-
2.2. COMPOSICION DE LA DIETA GENERAL	-36-
2.3. MODELOS DE SUBNUTRICION	-38-
2.3.1. Modelo de subnutrición en las ratas gestantes	-38-
2.3.2. Modelo de subnutrición en las ratas adultas	-39-
2.4. TOMA DE MUESTRAS	-40-
2.5. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.	-43-
2.5.1. Expresión de los resultados.	-44-
2.6. TECNICA PARA EL AISLAMIENTO E INCUBACION DE ISLOTES DE LANGERHANS.	-44-

2.6.1. Aislamiento de islotes en ratas adultas.	-44-
2.6.2. Aislamiento y cultivo de islotes fetales.	-46-
2.6.3. Incubación estática de los Islotes.	-47-
2.6.4. Extracción de la Insulina de los Islotes.	-48-
2.7. ESTUDIOS HISTOLOGICOS.	-48-
2.7.1. Fijación.	-49-
2.7.2. Corte.	-49-
2.7.3. Marcaje inmunocitoquímico.	-49-
2.8. CUANTIFICACION DE CELULAS B.	-51-
2.8.1. Principio del método estereológico utilizado para estimar la masa de células B pancreáticas.	-51-
2.8.2. Medición de la superficie de sección relativa (Aa) y de la proporción volumínica (Vv) de las células B.	-52-
2.8.3. Muestreo de los cortes a cuantificar.	-53-
2.9. DETERMINACION DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA.	-53-
2.10. TECNICAS ANALITICAS	-59-
2.10.1. Determinación de la glucosa en sangre.	-59-
2.10.2. Determinación de las proteínas.	-60-
2.10.3. Determinación radioinmunológica de Insulina.	-61-
2.10.4. Determinación fluorimétrica del DNA	-66-
2.11. EXPRESION DE LOS RESULTADOS Y CALCULOS ESTADISTICOS . . .	-69-
3.- RESULTADOS	-73-
3.1. ANALISIS Y ESTABLECIMIENTO IN VIVO DEL PERIODO CLAVE DE SUBNUTRICIÓN, DURANTE EL DESARROLLO ,QUE PROVOCA UNA MAYOR PERTURBACIÓN DE LA SECRECIÓN DE INSULINA.	-73-
3.1.1. Estudio de los efectos producidos en distintos parámetros variando el periodo gestacional de subnutrición.	-73-

3.1.1.1. Evolución del peso corporal en la madre durante la gestación.	-73-
3.1.1.2. Glucemia, insulinemia y contenido pancreático de insulina en madres de 21 días de gestación.	-75-
3.1.1.3. Peso de cuerpo y páncreas de los fetos de 21 días de gestación.	-77-
3.1.1.4. Glucemia, insulinemia y contenido pancreático de insulina de los fetos de 21 días de gestación.	-77-
3.1.1.5. Evolución del peso corporal durante la gestación de las ratas madres subnutridas desde el día 16 de gestación.	-80-
3.1.1.6. Estudio de los parámetros anteriores comenzando la subnutrición el día 16 de gestación.	-80-
3.1.1.7. Conclusiones del estudio de la subnutrición proteico-calórica variando la etapa gestante en que se provoca.	-83-
3.1.2. Estudio de la secreción de insulina en ratas madres subnutridas en el último tercio de la gestación y en sus fetos.	-83-
3.1.2.1. Tolerancia a la glucosa en madres de 21 días de gestación.	-83-
3.1.2.2. Secreción de insulina <i>in vitro</i> en madres de 21 días de gestación.	-86-
3.1.2.3. Secreción de insulina <i>in vitro</i> en fetos de 21 días de gestación.	-89-
3.1.2.4. Estudio histológico del páncreas de fetos de 21 días de gestación-	92-
3.1.2.5. Porcentaje y masa de células B de fetos de 21 días de gestación.	-93-
3.1.2.6. Conclusiones de los estudios realizados en madre y descendencia, subnutridos en el último tercio de la gestación.	-94-
3.2. ESTUDIO EN FETO, NEONATOS DE 4, 14 Y 23 DIAS DE VIDA Y EN ADULTO DE LAS REPERCUSIONES EN LA SECRECIÓN DE INSULINA DE LA SUBNUTRICIÓN COMENZADA EN EL ÚLTIMO TERCIO DE LA GESTACIÓN Y CONTINUADA HASTA LA EDAD ADULTA.	-97-
3.2.1. Consecuencias en distintos parámetros de la subnutrición comenzada en la última parte de la gestación.	-97-
3.2.1.1. Evolución del peso corporal.	-97-
3.2.1.2. Evolución del peso del páncreas.	-97-
3.2.1.3 Relación peso del páncreas/peso del cuerpo en los distintos estadios estudiados.	-99-

3.2.1.4. Evolución de la glucemia e insulinemia en las etapas estudiadas.	-102-
3.2.1.5. Evolución del contenido pancreático de insulina.	-102-
3.2.1.6. Secreción de insulina <i>in vitro</i> en ratas de 70 días de vida.	-105-
3.2.1.7. Estudio histológico del páncreas de ratas de 4 y 70 días de vida.	-108-
3.2.1.8. Porcentaje y masa de células B de ratas de 4 y 70 días de vida.	-108-
3.2.1.9. Conclusiones de los estudios realizados en distintas etapas de la vida de los animales subnutridos desde el último tercio de la gestación hasta la edad adulta.	-112-
3.3. ESTUDIO, EN PERIODO ADULTO, DE LAS CONSECUENCIAS DE DISTINTAS ETAPAS DE SUBNUTRICIÓN DURANTE EL DESARROLLO SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA.	-113-
3.3.1. Estudio comparativo en rata adulta de los efectos sobre la secreción de insulina de una subnutrición proteico-calórica en etapa fetal o fetal y lactante.	-113-
3.3.1.1. Evolución del peso corporal.	-113-
3.3.1.2. Glucemia, insulinemia y contenido pancreático de insulina en ratas adultas de 70 días de vida.	-115-
3.3.1.3. Tolerancia a la glucosa en ratas de 70 días de vida en ambas condiciones de subnutrición.	-115-
3.3.1.4. Secreción de insulina <i>in vitro</i> en ratas de 70 días de vida.	-119-
3.3.1.5. Conclusiones generales sobre los resultados obtenidos en etapa adulta subnutriendo los animales en dos etapas distintas del desarrollo: fetal o fetal y lactante.	-122-
3.4. ESTUDIO DE LAS CONSECUENCIAS DE 4 SEMANAS DE IDENTICA SUBNUTRICIÓN, EN PERIODO ADULTO, SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA.	-123-
3.4.1. Evolución del peso corporal.	-123-
3.4.2. Evolución de la glucemia, insulinemia y contenido pancreático de insulina en ratas adultas subnutridas cuatro semanas.	-123-
3.4.3. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratas de 56 días de vida subnutridas cuatro semanas previas.	-126-
3.4.4. Secreción de insulina <i>in vitro</i> en ratas adultas de 56 días de vida subnutridas durante 4 semanas previas.	-129-

3.4.5. Conclusiones de los experimentos realizados subnutriendo animales adultos durante cuatro semanas.	-132-
3.5. ESTUDIO DE LAS CONSECUENCIAS DE LA SUBNUTRICION SOBRE LOS NIVELES DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN MADRES Y SUS FETOS Y EN RATAS ADULTAS DE 70 D.V.	-133-
3.5.1. Niveles de GLUT-2 en las ratas controles y subnutridas.	-133-
3.5.2. Niveles de GLUT-1 en las ratas controles y subnutridas.	-136-
4. DISCUSION	-140-
4.1. ESTABLECIMIENTO DEL PERIODO CLAVE DE SUBNUTRICION EN LA ETAPA FETAL QUE PROVOCA UNA MAYOR PERTURBACION DE LA SECRECION DE INSULINA.	-140-
4.1.1. Efecto de la subnutrición sobre el incremento de peso corporal de las madres durante la gestación.	-141-
4.1.2. Efecto de la subnutrición sobre varios parámetros en la madre gestante-	143-
4.1.3. Efecto de la subnutrición sobre el peso del cuerpo y del páncreas fetal. . . .	-144-
4.1.4. Efecto de la subnutrición sobre la insulinemia y el contenido de insulina pancreática fetal.	-148-
4.2. SECRECION DE INSULINA EN RATAS MADRES SUBNUTRIDAS EN EL ULTIMO TERCIO DE LA GESTACION Y EN SUS FETOS.	-150-
4.2.1. Secreción de insulina <i>in vivo</i> en madres subnutridas de 21 días de gestación.	-150-
4.2.2. Secreción de insulina <i>in vitro</i> en madres de 21 días de gestación subnutridas.	-152-
4.2.3. Secreción de insulina <i>in vitro</i> en fetos de 21 días de gestación procedentes de madres subnutridas.	-155-
4.2.4. Efecto de la subnutrición sobre el desarrollo y morfología de las células B de fetos de 21 días de gestación subnutridos.	-158-
4.3. REPERCUSIONES DE LA SUBNUTRICION COMENZADA EN EL ULTIMO TERCIO DE LA GESTACION Y CONTINUADA HASTA LA EDAD ADULTA SOBRE LA SECRECION DE INSULINA. ESTUDIO EN FETO, NEONATOS DE 4, 14 Y 23 DIAS Y EN ADULTO DE 70 DIAS DE VIDA.	-161-
4.3.1. Efecto de la subnutrición sobre el peso del cuerpo y del páncreas.	-161-

4.3.2. Evolución de la funcionalidad del páncreas en las ratas subnutridas.	-164-
4.3.3. Secreción de insulina <i>in vitro</i> en ratas subnutridas desde la etapa fetal hasta los 70 días de vida.	-165-
4.3.4. Efecto de la subnutrición sobre la masa de células B de ratas subnutridas de 4 y 70 días de vida.	-169-
4.4. ESTUDIO, EN PERIODO ADULTO, DE LAS CONSECUENCIAS DE SUBNUTRIR DURANTE EL DESARROLLO SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA.	-173-
4.4.1. Estudio de la secreción de insulina en ratas de 70 días de vida subnutridas en etapas de desarrollo.	-174-
4.5. ESTUDIO DE LAS CONSECUENCIAS DE CUATRO SEMANAS DE SUBNUTRICIÓN, EN PERIODO ADULTO, SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA.	-178-
4.5.1. Características generales de las ratas subnutridas durante cuatro semanas en etapa adulta.	-178-
4.5.2. Secreción de insulina <i>in vivo</i> en ratas subnutridas durante cuatro semanas en la edad adulta.	-179-
4.5.3. Estudio de la secreción de insulina <i>in vitro</i> en ratas adultas subnutridas durante cuatro semanas.	-181-
4.6 EFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN SOBRE LOS NIVELES DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA. ESTUDIO EN MADRES Y SUS FETOS Y EN RATAS ADULTAS.	-184-
4.6.1. Efecto de la subnutrición sobre el transportador de glucosa GLUT-2.	-184-
4.6.2. Efecto de la subnutrición sobre el transportador de glucosa GLUT-1.	-185-
5.- CONCLUSIONES	-189-
6.- BIBLIOGRAFIA	-194-

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

La malnutrición proteico-energética puede considerarse un problema de importancia relevante por estar muy extendida en el Tercer Mundo; pero, además, es un modelo experimental interesante para aportar datos acerca de las capacidades adaptativas de los mamíferos en cuanto a la secreción de insulina.

1.1. ESTRUCTURA ENDOCRINA DEL PANCREAS

El páncreas es un órgano complejo que está formado por células secretoras endocrinas y otras no endocrinas. Ambos componentes están integrados en su función, produciendo por una parte las enzimas para la digestión (páncreas no endocrino) y por otra las hormonas que regulan el metabolismo de los nutrientes digeridos (páncreas endocrino).

Del volumen total del órgano, el páncreas endocrino representa aproximadamente del 2 al 3% y se encuentra disperso en el tejido exocrino formando unos microórganos denominados islotes de Langerhans. Estas estructuras fueron descritas por primera vez por Paul Langerhans en su tesis doctoral en 1869 aunque su función endocrina no se descubrió hasta 1889 cuando Minkowski y Von Mering establecieron la relación de la glándula con el metabolismo de los carbohidratos y la diabetes (Von Mering y Minkowski, 1889).

Los islotes adultos contienen más del 90% de las células endocrinas pancreáticas, apareciendo el resto de forma individual o formando pequeñas agrupaciones. Los tipos celulares identificados histológicamente en los islotes de Langerhans han sido las células A, B, D, PP y D1; de ellas, las cuatro primeras han sido funcionalmente identificadas. Las células A (15-20% de la masa endocrina) contienen glucagón, un péptido cuya acción hiperglucemiante fue descubierta en 1923

(Grimelius y cols., 1978), aunque su localización celular no fue establecida hasta 1962 (Baum y cols., 1962). Las células B (70-80% de la masa endocrina) contienen insulina, aislada por primera vez por Banting y Best (Banting y Best, 1922) y localizada dentro de las células B por Lacy (Lacy, 1959). Las células D fueron identificadas en 1931 (Bloom, 1931) y en 1975 se encontró que contenían somatostatina (Orci y cols., 1975), un potente inhibidor de muchas funciones endocrinas, incluyendo la liberación de todas las hormonas pancreáticas (Gerich y cols., 1976). Por último, las células PP son las productoras de polipéptido pancreático.

En la mayoría de las especies las células B se localizan en los islotes formando un denso núcleo homocelular y se encuentran rodeadas del resto de tipos celulares que forman así una corteza heterocelular. Esta disposición sugiere que las células de la corteza, que reciben primero los estímulos, procesan la información que ingresa y actúan conjuntamente para regular la función de las células B; es decir, la respuesta insulino-secretora de las células B va a depender no sólo del número e integridad de las células, sino también de la microanatomía y organización funcional del islote. Para que se produzca una buena respuesta, se necesita la cooperatividad del resto de las células de los islotes (Pipeleers y cols., 1981).

En comparación con el componente no endocrino, los islotes reciben de 5 a 10 veces más sangre por volumen de tejido (Lafson y cols., 1992). El gran número de vasos sanguíneos resulta en una morfología en la que las células B están frecuentemente rodeadas por dos o más capilares (Mc Cusky y Chapman, 1969). A su vez, los islotes pancreáticos están inervados por vías parasimpáticas colinérgicas, simpáticas adrenérgicas y varios nervios peptidérgicos. Estos tres tipos de neuronas no parecen estar asociados con un tipo particular de célula del islote (Richeus, 1945).

1.1.1. Desarrollo de las células B

El desarrollo de las células pancreáticas ha sido exhaustivamente estudiado por Mc Evoy (Mc Evoy, 1981). El día 16 de gestación las células B están presentes pero de forma dispersa y las células A son las más numerosas, representando al menos el 2% de la masa total del páncreas y el 96% de la masa de células endocrinas.

Durante el periodo anterior al nacimiento hay un rápido aumento en la masa de todas las células endocrinas y particularmente de las células B; concretamente, en los fetos de rata, el aumento de la masa de células B es más del doble entre los dos últimos días de vida intrauterina (entre el día 20 y 22) (Hellerstrom, 1984). Así, al nacimiento, las células B son el tipo predominante, representando el 65% de la masa total endocrina, siendo el 32% de células A y el 2.5% de células D. En el periodo prenatal temprano, el día 4 de vida, se ha observado también un aumento muy marcado de la masa de células B; ésta se mantiene constante entre los días 10 y 20 de vida y aumenta 10 veces hasta el día 210 de vida (Portha, 1990). En contraste, el volumen de células A en el día 50 no difirió del observado el día 210 y las células D alcanzaron su volumen máximo en el día 35. Estos datos sugieren que en las ratas el volumen de células B muestra un continuo aumento con la edad, mientras que el volumen de células A y D marca un valor máximo relativamente pronto en la vida del animal.

1.1.2. Crecimiento de las células de los islotes y factores implicados

A lo largo de la vida de un animal, en el desarrollo, crecimiento y madurez, la masa de células B varía y está regulada para mantener unos niveles normales de glucemia (Swenne, 1992). Si esta homeostasis falla y hay una pérdida relativa o

absoluta de células B, la diabetes puede aparecer. Para la homeostasis, esta regulación va a implicar tanto un aumento como una disminución en la masa de células B, y los mecanismos por los que se va a llevar a cabo van a ser cambios en el índice de replicación/muerte, en el volumen individual de las células y en la diferenciación de nuevos islotes. Estos cambios van a ocurrir también en situaciones como la gestación, obesidad y, en definitiva, en cualquier estado en el que varíe la demanda funcional.

Hay dos vías de crecimiento tanto en etapas de desarrollo como en respuesta a una mayor demanda: a) expansión por replicación o hipertrofia de células B preexistentes y b) crecimiento de nuevos islotes por diferenciación del epitelio pancreático ductal.

Expansión de la masa de células B a partir de células B preexistentes

Durante el desarrollo, la masa de células B se expande por diferenciación de nuevas células, pero, en estados fetales posteriores, se diferencian por replicación de células B preexistentes (Hellerstrom y cols., 1988). Después del nacimiento, el principal medio de expansión es la replicación pero con una capacidad que va disminuyendo con la edad.

El regulador fisiológico más importante para el crecimiento de las células B es probablemente la glucosa. Este efecto estimulador se ha encontrado tanto *in vivo* (Logothetopoulos y cols., 1983) como *in vitro* (Sweene, 1982). Aparte de la glucosa, la manosa o una mezcla de aminoácidos esenciales, que son metabolizados por la célula B, estimulan la replicación (King y Chick, 1976), mientras que la inhibición del metabolismo de la glucosa (King y cols., 1978) y los azúcares no metabolizables no estimulan la replicación (King y Chick, 1976). Todos estos datos indican que la

replicación de las células B, en paralelo con la biosíntesis y la liberación de insulina, está también ligada al metabolismo de los sustratos reguladores.

Los miembros de la familia de la hormona de crecimiento (lactógeno placentario y prolactina), son otros de los estímulos a considerar. Los estudios *in vivo* se han centrado en la gestación, ya que el incremento de la demanda metabólica en este estado está acomodada a cambios en la respuesta insulino-secretora y aumento de la masa de células B. En la rata, en el día 20 de gestación, la masa de células B aumenta un 50% con respecto al valor de las ratas vírgenes (Merynissen y cols., 1983), debido tanto a un aumento en la replicación como en el volumen de las células B. El aumento en la replicación fue correlacionado con el lactógeno placentario (PL) (Parsons y cols., 1992). También *in vivo* se ha mostrado que la hormona de crecimiento (GH) y la prolactina (PRL) producen hiperplasia de las células B (Parson y cols., 1983). Cuando se valoran las tres hormonas juntas, la efectividad en estimular tanto la secreción de insulina como la replicación de células B es en el orden PL > PRL > > GH (Brelje y cols., 1993).

El efecto del suero sobre la replicación de las células B se conoce también desde hace tiempo, pero aún no está claro cuales son los factores dentro del suero que desempeñan este papel fisiológico.

Crecimiento de nuevos islotes por diferenciación del epitelio ductal pancreático

El desarrollo embriológico del páncreas ha sido extensamente descrito (Ruttler y cols., 1978) y pocas cosas se han añadido en las últimas dos décadas. Aunque todos los tipos de células pancreáticas se diferencian a partir del mismo epitelio ductal, no está claro si todas proceden de una misma población de células precursoras.

Aparte del desarrollo embriológico, la formación de nuevas células se ha visto en la etapa fetal y postnatal (Portha, 1990). En el páncreas adulto aunque ocurre de forma ocasional (en respuesta a un estímulo "dramático" y a bajos niveles para un continuo "rellenado" de la población de células B) se ha podido inducir experimentalmente (Rosemberg y Vinik, 1992).

Poco se conoce sobre los factores implicados en la morfogénesis del páncreas. El factor de crecimiento transformante (TGF-alfa) se sabe que estimula la proliferación de células precursoras pero no la diferenciación (Wang y cols., 1993). Por su parte, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que actúa sobre el mismo receptor del TGF-alfa, estimula la proliferación del epitelio ductal (Verme y Hootman, 1990). Otro factor implicado ha sido la gastrina, que parece facilitar la diferenciación de las células precursoras pero no tiene efecto sobre la expansión de la población. El IGF-1 parece desempeñar un papel en la diferenciación de células precursoras (Smith y cols., 1991) y el TGF-beta un papel inhibidor de la proliferación de células del epitelio ductal (Bonner-Weir y Smith, 1994).

Se conocen, por tanto, un gran número de factores de crecimiento que podrían desempeñar un papel en alguno de los pasos de la neogénesis de células de los islotes; si bien, en este momento hay todavía factores desconocidos que pueden estar de igual forma implicados.

1.2. FUNCION DE LAS CELULAS B

1.2.1. Secreción de insulina en respuesta a distintos estímulos.

La ingestión y absorción de nutrientes genera una serie de estímulos que actúan sobre las células B provocando la secreción de insulina (Morgan, 1992).

En este sentido, las células beta del páncreas endocrino funcionan como

detectores metabólicos capaces de adaptar la secreción de insulina a fluctuaciones de la glucemia y a cambios en la concentración plasmática de sustratos energéticos tales como aminoácidos, ácidos grasos y cuerpos cetónicos. Esta acción está además complementada por componentes hormonales y neuronales.

La regulación de la secreción de insulina, bajo el efecto de los nutrientes, hormonas o neurotransmisores, va a ser el resultado de una secuencia compleja de sucesos que comenzará por la identificación de la sustancia considerada, continuará por la emisión y amplificación de una o varias señales intracelulares y terminará con la secreción de insulina propiamente dicha, es decir, con la liberación de los gránulos de secreción por un mecanismo de exocitosis.

Acción de los nutrientes

1.- Glucosa y otros azúcares.

A pesar de lo dicho anteriormente, hay que remarcar que la glucosa ocupa un lugar excepcional como reguladora de la secreción de insulina, mientras que el resto de los sustratos energéticos actúan como "potenciadores de la glucosa", es decir, son ineficaces solos pero son capaces de aumentar la secreción de insulina en presencia de glucosa. Por ello, analizaremos más en profundidad el papel de la glucosa que el de otros sustratos.

El efecto de la glucosa (al igual que la manosa) sobre la liberación de insulina está ligado a la capacidad de las células B para transportar y metabolizar el azúcar (Malaisse, 1992).

Durante mucho tiempo se mantuvo la hipótesis según la cual la glucosa desencadenaría la respuesta secretora de las células B por acción de un receptor membranal específico (Matchinsky y cols., 1975). Sin embargo, la existencia de un

receptor para la glucosa no ha sido nunca demostrada. Por el contrario, se han ido acumulando argumentos en favor de la hipótesis que mantiene que la glucosa debe de ser metabolizada por la célula B para desencadenar una secreción de insulina. A esta teoría se le ha denominado "teoría metabólica" (Malaisse y cols., 1979).

La D-glucosa penetra en las células B gracias a un transportador estereoespecífico de alta capacidad e independiente de Na^+ (GLUT 2). La concentración de glucosa intracelular se equilibra de forma casi instantánea con la concentración extracelular, lo cual indica que el transporte no es limitante y no es, por tanto, un sitio de control en las células B.

En condiciones fisiológicas, la transformación de la glucosa en sorbitol o su metabolismo por la vía de las pentosas fosfato es muy débil. Por tanto, es la glucolisis la vía principal del metabolismo de la glucosa en las células B y el posible lugar de control de ésta.

Cuando la glucosa entra en la glucolisis comienza a ser fosforilada. Las células B poseen dos enzimas que catalizan esta reacción: por un lado una hexokinasa que tiene fuerte afinidad por su sustrato, pero que se inhibe eficazmente por su producto (glucosa-6-fosfato) y, por otro lado, una glucokinasa con débil afinidad por el sustrato pero cuya actividad es poco inhibida por la glucosa-6-fosfato. Debido a las propiedades de esta glucokinasa, que le permiten adaptar la velocidad de degradación de la glucosa a la concentración ambiental de esta molécula, está considerada como la "detectora de glucosa" de las células B. En efecto, puede suponerse que cuando la concentración de la glucosa en el exterior aumenta, le sigue un aumento de glucosa en el interior de la célula y un aumento de la velocidad de fosforilación, que conduce a su vez a un aumento del flujo glucolítico. Además, parece que la activación de la enzima 1,6-fosfofructokinasa (que cataliza el paso de

fructosa-6-fosfato a fructosa 1,6-bifosfato) es necesaria para que la velocidad de fosforilación de la fructosa-6-fosfato siga a la de la glucosa (Sener y Malaisse; 1984). Por tanto, la glucokinasa y, en menor grado, la fosfofructokinasa podrían desempeñar un papel modulador.

Sin embargo, no podemos olvidar que de todo el piruvato formado en la glucolisis, entre un 25% y un 30% es oxidado en las mitocondrias; por lo tanto, el metabolismo mitocondrial aumenta relativamente más que la glucolisis en el momento en que se eleva la concentración de glucosa. Por esto, se admite generalmente que una aceleración del metabolismo oxidativo mitocondrial puede desempeñar un papel esencial en la respuesta secretora de la célula B a la glucosa y otros nutrientes (Henquin, 1990).

Una vez vistos los posibles puntos de control de la glucosa en la célula B habría que identificar cuáles son las conexiones entre los cambios metabólicos y la secreción de insulina, pero esta identificación es extremadamente compleja. Las señales metabólicas podrían provenir de factores producidos por la oxidación de los sustratos en el transcurso del metabolismo: protones (H^+), equivalentes reducidos (NADH, NADPH, glutatión reducido) e intermediarios de alta energía (ATP). Estos factores, generados por el catabolismo de la glucosa, podrían afectar a la conductancia de la membrana de las células B al K^+ o a la actividad de enzimas implicadas en la regulación de los hechos que tienen lugar en el proceso de secreción propiamente dicho (Malaisse y cols., 1984).

Los fenómenos clave del mecanismo principal por el cual la glucosa estimula la secreción de insulina serían los siguientes: a) La conductancia elevada del K^+ en las membranas de las células beta en reposo se debe a los canales de K^+ sensibles a ATP; b) El metabolismo de la glucosa conduce al cierre de estos canales

modificando la relación ATP/ADP o aumentando el ATP; c) La disminución de la conductancia para el K^+ lleva consigo una despolarización de la membrana que hace que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se activen y sobrevenga una entrada de Ca^{2+} ; d) El aumento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmática activa un sistema efector que conduce a la exocitosis de los gránulos de insulina (Henquin, 1990).

Por tanto, el ATP actuaría como agente de unión entre los sucesos metabólicos y los flujos iónicos responsables de la insulinosécréción. No obstante, no se ha probado todavía que un cambio de la concentración de ATP justamente bajo la membrana plasmática, sea el único mecanismo o bien sea indispensable para el control de estos canales de K^+ ; pero esta hipótesis es, actualmente, la más plausible. Por ello, aunque hay acuerdo sobre la secuencia inicial de sucesos en respuesta a la glucosa, la exacta naturaleza del acoplamiento del metabolismo a los sucesos de membrana es todavía una cuestión de debate.

Como hemos visto, la glucosa, a través de su metabolismo, contribuye a regular la concentración de iones Ca^{2+} intracelulares y, por medio de ello, la secreción de insulina. Pero además, existen otras moléculas igualmente implicadas en la modulación de la concentración intracelular de los iones cálcicos y por tanto en la secreción. El metabolismo de la glucosa va a mediar cambios en los niveles de segundos mensajeros insulínotropos, incluyendo nucleótidos de pirimidina, nucleótidos cíclicos e inosítoles fosfato que pueden tener un efecto modulador sobre la secreción de insulina (Laychock y cols., 1990).

2.- Aminoácidos.

Varios aminoácidos estimulan la secreción de insulina, aunque existen diferencias considerables en cuanto a su potencia y a los mecanismos a través de los cuáles aumentan la concentración de calcio y disparan la exocitosis (Gerich y cols.,

1976; Henquin, 1987). La leucina, arginina y lisina son considerados los estimuladores más potentes y, de ellos, sólo la leucina es capaz de estimular la secreción de insulina en ausencia de glucosa (Henquin y Meissner, 1986). Los estudios realizados con leucina, arginina, lisina y alanina han demostrado tres mecanismos básicos por los cuales parece estar mediado el efecto de los aminoácidos sobre la liberación de insulina (Flatt y cols., 1991).

La leucina es transportada dentro de la célula B donde es metabolizada produciendo cambios en el potencial de membrana y el flujo iónico similares a los descritos para la glucosa. El primer producto catabólico del metabolismo de la leucina, el 2 cetoisocaproato, estimula la secreción de insulina aumentando la concentración de ATP e inhibiendo los canales de potasio sensibles a ATP presentes en las membranas de las células B (Ashcroft y cols., 1987).

El efecto de la arginina y lisina sobre la liberación de insulina es diferente del de la leucina ya que estos aminoácidos no son metabolizados y entran en la célula B a través de un sistema de transporte específico para aminoácidos catiónicos. El transporte de estos aminoácidos despolariza la membrana y conduce a la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y la consecuente entrada de calcio (Henquin, 1987).

La alanina entra en la célula B en asociación con iones de sodio y la actividad insulínica del aminoácido parece estar relacionada con la habilidad del cotransporte de sodio que eleva la concentración de calcio interna e inhibe el cambio sodio-calcio (Henquin, 1987).

3.- Ácidos grasos y cuerpos cetónicos.

Ciertos ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos presentan en presencia de glucosa un efecto estimulador sobre la función de las células B muy modesto.

Además, las concentraciones altas de ácidos grasos de cadena corta y larga y de cuerpos cetónicos se ha visto que son capaces de estimular la secreción de insulina (Gerich y cols., 1976). Parece ser que el efecto de estos productos pasa por la habilidad de las células B para metabolizarlos.

Aunque el significado fisiológico del efecto directo de los ácidos grasos sobre la función de las células B es todavía discutido, no hay duda de que la activación del eje entero-insular por ciertos ácidos grasos libres amplifica marcadamente la estimulación en respuesta a la glucosa. Además, los ácidos grasos se cree que desempeñan un papel importante a largo plazo en la función de las células B, a través de la síntesis de triacilgliceridos y fosfolípidos que sirven de sustratos endógenos de las células B para la generación de segundos mensajeros como el inositol tri-fosfato y el diacilglicerol (Best y Malaisse, 1983; Morgan y Montagne, 1992).

Acción de los neurotransmisores

Los islotes pancreáticos reciben una rica inervación del Sistema Nervioso Autónomo (Flatt y col, 1991). Aunque la inervación neuronal no parece desempeñar un papel principal en la respuesta insulínica, se ha establecido que la activación colinérgica contribuye de forma importante al proceso de acoplamiento estímulo-secretor. Los neurotransmisores colinérgicos clásicos, acetilcolina y colecistoquinina, aumentan la secreción de insulina en presencia de glucosa activando la fosfolipasa C. Esta activación genera dos mensajeros intracelulares, el inositol tri-fosfato y el diacilglicerol (Berggren y cols., 1992), que actúan aumentando la concentración de calcio interna a partir de las reservas intracelulares de calcio y disparan la maquinaria de secreción. Además de esta acción directa, los agentes colinérgicos

pueden amplificar la liberación de insulina al estimular la secreción de glucagón (Gerich y cols., 1976) y de péptidos insulínotropicos (VIP, PHI, GRP) (Flatt y cols., 1991).

Por su parte, las catecolaminas actuarían inhibiendo la secreción de insulina a través de la inhibición de la adenilato ciclasa (Henquin, 1990).

Acción de las hormonas

Un gran número de hormonas son capaces de estimular la secreción de insulina por las células B pancreáticas en presencia de glucosa. El glucagón, el polipéptido gastrointestinal inhibidor (GIP) y los péptidos similares al glucagón (GLPs) aumentan la secreción de insulina al activar el sistema adenilato ciclasa, mientras que la colecistoquinina amplifica la secreción a través de la activación de la fosfolipasa C (Flatt y cols., 1991).

Las principales hormonas inhibidoras de la secreción de insulina serían las catecolaminas, galanina y somatostatina, que actuarían inhibiendo la adenilato ciclasa y repolarizando la membrana de las células B, aumentando así la conductancia para el potasio (Henquin, 1990).

1.3. SUBNUTRICION Y ACTIVIDAD DE LAS CELULAS B

Como acabamos de ver, en los estados fisiológicos normales hay dos mecanismos que controlan la actividad de las células B: por un lado, una regulación minuto a minuto de la liberación de insulina por la célula B y, por otro, una adaptación a largo plazo que implica cambios en el número total de células B. Si alguno de estos mecanismos falla, se va a producir una alteración en la homeostasis glucídica que puede provocar el desarrollo posterior de determinados tipos de

diabetes.

En este sentido, la relación entre diabetes y estado nutricional es bien conocida y es objeto de numerosos estudios. Se sabe que la sobrealimentación posee un efecto en el desarrollo de la diabetes tipo II; la situación nutricional contraria, la restricción de alimentos, aunque en un principio se pensó que podía proteger contra la diabetes, hoy es un hecho probado que favorece, también, el desarrollo de esta enfermedad. Si bien, el papel exacto que desempeña la malnutrición en la etiología de la diabetes es todavía discutido.

Los estudios realizados en humanos y en modelos animales revelan que en la malnutrición es constante la aparición de niveles disminuidos de insulina circulante debidos a una menor capacidad pancreática para secretar la hormona (Swenne y cols., 1992; Becker, 1983; Rao, 1982). Además, la respuesta secretora de insulina a la glucosa está marcadamente reducida (Crace y cols., 1991; Swenne y cols., 1988; Swenne y cols., 1987). Se piensa que esta permanente deficiencia de insulina es la causa de la característica intolerancia a una sobrecarga de glucosa observada en seres humanos y animales subnutridos (Rao, 1988; Weinkowe y cols., 1976); si bien, algunos autores explican esta situación como resultado de una resistencia tisular a los efectos insulínicos más que a una deficiencia de insulina (Bowie, 1964). Sin embargo, este hecho ha sido discutido al describirse casos en los que existe una tolerancia a la glucosa prácticamente normal a pesar de tener una respuesta secretora de insulina deprimida (Escrivá y cols., 1990; Okitolonda y cols., 1987). Estos resultados sólo pueden explicarse si se admite que la insulina, secretada en menor proporción, es capaz de producir efectos más intensos (Escrivá y cols., 1992; Escrivá y cols., 1991). Recientemente, Cacho (1993) ha mostrado un aumento en la capacidad de respuesta a la insulina en los tejidos periféricos de animales sometidos

a malnutrición. Por tanto, parece ser que la intolerancia a la glucosa puede ser debida, realmente, a una disminución de la secreción de insulina.

En cualquier caso, lo que sí parece aceptado es que en la malnutrición la secreción de insulina *in vivo* está disminuida, aunque la naturaleza de esta alteración permanece poco clara.

1.3.1. Efecto sobre la funcionalidad de las células B

Se ha sugerido la existencia de anomalías en el mecanismo estímulo-secreción de la célula beta que puedan explicar esta pérdida de secreción de la hormona. Younoszai y Dixit (1980) y Khardori y cols. (1980) propusieron que la causa del defecto podría ser una disminución del número de sitios de reconocimiento de la glucosa en las células B. El transporte de la D-glucosa a través de la membrana plasmática de las células B está mediado por GLUT-2, un transportador de glucosa similar al encontrado en hepatocitos. Una anomalía en el transportador de glucosa podría representar una posible causa del defecto funcional de las células B. Sin embargo, Weinkowe y cols. (1976) explican la disminución en la secreción de insulina como una inmadurez de la función endocrina del páncreas. Otros autores también han sugerido que debido al papel que desempeña el potasio en el mecanismo secretor de las células B, la deficiencia de potasio que tiene lugar en la subnutrición puede ser una razón para la reducción de la liberación de insulina (Mann y cols., 1975).

Los estudios realizados sobre los efectos que tiene el ayuno en la secreción de insulina pueden mostrar las distintas adaptaciones que se producen en respuesta a una falta de nutrientes. De esta manera, se han relatado cambios en los niveles de AMP cíclico y de Ca^{2+} que pueden afectar al mecanismo de acoplamiento estímulo-

secreción (Joost y Beckmann, 1980; Oliver y cols., 1977) e incluso Svenningsen y Bonnerie-Nielsen (1984) proponen que parte del defecto sobre la secreción de insulina está relacionado con cambios en el flujo glucolítico, mediados posiblemente por la enzima glucokinasa.

A pesar de todas estas consideraciones, Dixit y Sorenson (1987), estudiando la respuesta *in vitro* de los páncreas de animales malnutridos, no encontraron evidencias de un defecto en el mecanismo de estimulación de la liberación de insulina en respuesta a la glucosa, por lo que sugirieron que la mala secreción de la hormona podría estar debida a algún tipo de inhibición *in vivo* más que a un defecto del mecanismo secretor. En este sentido, hemos de tener en cuenta que la malnutrición afecta al normal desarrollo del Sistema Nervioso Central (Morgane y cols., 1978) y que la secreción de insulina está también controlada por señales de origen neruornal (acetilcolina, aumentándola; norepinefrina, disminuyéndola) (Henquin, 1990); por tanto, la modulación de la secreción de insulina a través de factores neroendocrinos podría estar afectada por la malnutrición.

1.3.2. Efecto sobre la estructura y desarrollo de las células B.

Además de las modificaciones funcionales de las células B, no debemos olvidar que la mala secreción de insulina puede ser debida, también, a alteraciones estructurales, por lo que debemos mencionar el efecto que la subnutrición puede provocar sobre el desarrollo normal de las células de los islotes. De este modo, el estudio histológico del páncreas endocrino muestra que la malnutrición proteico-calórica produce un deterioro de las células B. Se ha recalcado la existencia de defectos estructurales (disminución de la masa de células de los islotes así como del tamaño y del número de células B) que pueden llevar a una disminución de la

reserva de producción de insulina (Swenne y cols., 1992). En el mismo sentido, los gránulos de las células B (que constituyen el lugar de almacenamiento de la insulina) se han encontrado disminuidos en conjunto e individualmente contienen menor cantidad de insulina (Rao, 1988), lo que explicaría por qué la reserva secretora de la hormona está disminuida en la malnutrición proteico-calórica. Por tanto, los estudios ultraestructurales confirman que la malnutrición, probablemente, causa defectos estructurales en las células B que contribuyen, en cierta medida, a su impedimento funcional.

En cuanto al desarrollo de las células B, la malnutrición puede debilitar la capacidad de las células B para regenerarse después de una agresión. Se ha mostrado que el índice de síntesis de proteínas y/o crecimiento celular está disminuido (Swenne y cols., 1987); si la subnutrición ocurre dentro del periodo crítico de desarrollo de los tejidos, se provoca un debilitamiento de la maduración y un déficit irreversible en el número de células a partir de las cuales se debe producir el crecimiento posterior por hipertrofia (Rao, 1988). Por otro lado, los aminoácidos esenciales son potentes estimuladores del crecimiento de las células B y, en los individuos malnutridos, se da una reducción de aminoácidos esenciales (Rao, 1982) que puede ser la base del debilitamiento de la reserva insulino-secretora.

En resumen, de todo lo expuesto se puede desprender que la malnutrición proteico-calórica podría tener un efecto directo sobre las células B produciendo no sólo una respuesta secretora disminuida sino también atrofia y una menor capacidad para crecer y replicarse, provocando, así, una reducción de la reserva productora y secretora de insulina.

Este hecho, junto con la existencia de síndromes diabéticos relacionados con

la malnutrición, ha propiciado la realización de numerosos estudios encaminados a descubrir el posible papel que desempeña la malnutrición en el desarrollo de la diabetes.

1.4 DIABETES Y MALNUTRICION

La diabetes está reconocida como una enfermedad estrechamente ligada a la nutrición, tanto en su etiología como en su tratamiento.

Desde la antigüedad, se ha observado la importancia de la sobrealimentación en el desarrollo de la diabetes. Hay evidencias de que la obesidad es el más importante factor de riesgo ambiental para esta enfermedad. En el contexto clínico, se ha visto que la mayoría de los obesos son intolerantes a la glucosa y más de los dos tercios de diabéticos son obesos; además, si estos individuos reducen su peso, se puede mejorar e incluso normalizar la tolerancia a la glucosa (Berkowitz y cols., 1985).

Estas observaciones sirvieron, hace algunos años, para propagar una singular visión unidireccional de la relación entre diabetes y nutrición, según la cual se asumía que millones de individuos pobres y malnutridos que vivían en los países del Tercer Mundo estaban relativamente inmunizados contra la diabetes; esta idea se vio avalada por las observaciones de una disminución de la prevalencia de esta enfermedad en periodos de guerra y restricción de comida (durante la II Guerra Mundial) (Goto y cols., 1958).

Sin embargo, tras obtenerse datos epidemiológicos exactos y fiables en áreas del Tercer Mundo (donde existe malnutrición proteico-energética), se vio que los índices de prevalencia de enfermedad en estas zonas eran muy similares a los de países desarrollados y que sus manifestaciones clínicas diferían realmente de los

síndromes clásicos de diabetes (West y cols., 1971).

En estos últimos años, los síndromes diabéticos relacionados con la malnutrición han sido claramente descritos y están considerados como entidades separadas: Diabetes pancreática fibrocalculosa y Diabetes pancreática por deficiencia de proteínas (WHO, Study Group, 1985).

Los estudios que revelan la verdadera prevalencia de la diabetes en las poblaciones donde existe malnutrición proteico-energética, sugieren que la malnutrición puede ser un factor importante para el desarrollo de diabetes (Rao, 1988). No obstante, todavía no está clara la forma en que malnutrición y diabetes interactúan. Las hipótesis que actualmente se consideran son:

1.- Implicar a la malnutrición como un factor causal capaz de producir una pérdida progresiva de la función de las células B o impedir la regeneración y reparación de células B dañadas.

2.- Considerar la malnutrición como potenciador de los efectos de otras influencias diabetógenas. La malnutrición puede causar una disminución de la reserva de producción de insulina que provocaría intolerancia a la glucosa o incluso diabetes cuando se produjera un aumento en la demanda de insulina por alguna enfermedad o agente ambiental desconocido.

Más recientemente, Hales y Barker (1992), han implicado también a la malnutrición en la etiología de la diabetes tipo II. La hipótesis de estos autores propone que una nutrición deficiente en la etapa fetal y postnatal es negativa para el desarrollo y la función de las células B de los islotes de Langerhans. Este defecto de la estructura y función (incluyendo posibles fallos en la anatomía de los islotes tales como la vascularización y la inervación) predispone al desarrollo posterior de la diabetes tipo II.

Por todas estas razones, debe reconocerse que la malnutrición, al igual que la obesidad, está implicada en la etiopatogénesis de la diabetes. En realidad, debido a la extensión de la malnutrición proteico-energética, pueden existir mayor número de diabéticos por malnutrición que por obesidad.

Por ello, se pueden considerar de gran importancia los estudios, tanto en clínica como en ciencia básica, de los distintos efectos de la malnutrición sobre aspectos importantes de la homeostasis glucídica.

1.5. PLANTEAMIENTO Y CONCLUSIONES GLOBALES DEL TEMA

La insulina, aparte de sus conocidas acciones como glucorregulador en el periodo adulto, es una hormona muy importante como regulador del crecimiento en periodos de inmadurez (Milner y Hill, 1984).

Dentro de las alteraciones adquiridas del desarrollo, los nutrientes parecen tener un papel primordial ya que regula determinados factores endocrinos genéticamente establecidos para regular el crecimiento (Pascual-Leone y cols., 1994; Pascual-Leone, 1994). Por ello, la subnutrición se puede considerar como la perturbación clave dentro de las alteraciones adquiridas del desarrollo. Además, ha sido establecido el posible factor de riesgo para la diabetes que parece ser la subnutrición en países del Tercer Mundo (Rao, 1980). Se sabe que la diabetes en la gestación (Erikson y cols., 1993) produce una hiperplasia fetal en los islotes de Langerhans. En nuestro grupo (Escrivá y cols., 1992), hemos establecido que la subnutrición proteico-energética desde el periodo gestante produce una mala secreción de insulina junto a una hipersensibilidad de la hormona en tejidos diana. Por otra parte, la subnutrición ha sido estudiada fundamentalmente en humano (Rao, 1980) y faltan estudios sistemáticos que se realicen en circunstancias homogéneas. La subnutrición es primordialmente un fenómeno de adaptación y dicha adaptación será distinta si varían las circunstancias cualitativas en cuanto a dieta y a momento en que se establece la malnutrición.

Una de las alteraciones más significativas de la adaptación al ayuno es el decrecimiento de la insulina circulante. En este trabajo, se estudia sistemáticamente para un mismo tipo de subnutrición proteico-calórica cuál es el periodo de desarrollo en el cual la repercusión en la secreción de insulina es mayor, concluyendo que es el último tercio de la gestación, punto 3.1.

Una vez establecido dicho periodo se realiza un estudio pormenorizado de las alteraciones en dicha secreción en distintas etapas de desarrollo y en periodo adulto. En ese estudio la subnutrición comienza en el último tercio de la gestación y se continua hasta el periodo adulto, punto 3.2.

Con el fin de establecer si la subnutrición en periodos de inmadurez produce un deterioro permanente del páncreas, concretamente en el desarrollo de los islotes o en su capacidad funcional, se subnutren animales en periodo fetal o fetal y lactante y se sacrifican en edad adulta. De acuerdo con Rasschaert y cols. (1995) se establece que la subnutrición durante el periodo fetal no provoca daños irreparables en la secreción de insulina en el periodo adulto y nuestros resultados muestran que tampoco se producen éstos en etapa fetal y lactante, punto 3.3. Ello indica que las alteraciones de la secreción de insulina encontradas en adultas subnutridas son la consecuencia de un proceso adaptativo funcional a la falta de nutrientes y no una alteración del normal desarrollo de los islotes de Langerhans, producido en etapas inmaduras.

Para ratificar dicha aseveración se realiza un estudio en la última parte del trabajo subnutriendo a los animales adultos con la misma restricción proteico-calórica durante cuatro semanas, punto 3.4. Como se expone a continuación, se obtuvieron las mismas perturbaciones adaptativas en la secreción de insulina que cuando se comenzó en etapas inmaduras y se continuó hasta la edad adulta.

Por último, se inicia un estudio tratando de establecer si la disminuida secreción de insulina en los animales subnutridos se puede explicar por una alteración en el transportador de glucosa, punto 3.5.

Creemos que este estudio sistemático aporta pruebas irrefutables a que la mala secreción de insulina en animales subnutridos desde el periodo gestante es una

consecuencia de un proceso adaptativo y no de ninguna perturbación irreversible producida en el desarrollo de los islotes del páncreas en etapas inmaduras.

MATERIAL Y METODOS

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. ANIMALES

A lo largo del trabajo que constituye la presente tesis, se han utilizado ratas de la raza Wistar obtenidas del propio criadero del Instituto de Bioquímica (Centro mxto CSIC-UCM, ubicado en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia). Criar nuestros propios animales ha permitido ejercer un estricto control de sus condiciones nutricionales y generales, tanto en las etapas gestacional y lactante como en la adulta; dicho control es imprescindible en los modelos experimentales que han sido objeto de este trabajo.

En el mencionado criadero existe un acondicionador de temperatura que mantiene esta variable ambiental constante entre 22 y 24 °C. Por otra parte, las ratas están sometidas a un ciclo de luz/oscuridad automático, gracias a un reloj controlador que ilumina la estancia a las 7.00 h y la oscurece a las 19.00 h.

El inicio de la gestación fue establecido mediante la observación, por frotis, de la presencia de espermatozoides en la vagina de la rata (180-200 g) al día siguiente de su apareamiento con el macho (300-400 g); dicha condición se confirmó a los 14 días por palpación abdominal. El día del nacimiento (día 0 de vida) todas las camadas se uniformaron, disponiéndose 8 crías machos en cada una. Las ratas se destetaron el día 25 de vida y se agruparon en jaulas que contenían 4 animales.

2.2. COMPOSICION DE LA DIETA GENERAL

El alimento suministrado fue el pienso SANDERMUS S-10, adquirido en SANDERS; se presenta en forma de porciones prensadas cuya composición, en gramos por ciento, es la siguiente:

Proteínas.....	18
Grasas.....	2.5
Almidón.....	35
Azúcares totales.....	3.5
Cenizas.....	8
Fibra.....	5.5
Humedad.....	13
Calcio.....	1.2
Fosfato.....	0.65
ClNa.....	0.6

El resto de los ingredientes está constituido por una mezcla de minerales y vitaminas, cuya composición es la siguiente:

MINERALES (mg/Kg de pienso)

Cobalto	0.6
Yodo.....	1.5
Selenio.....	0.3
Cobre.....	15
Hierro.....	25
Zinc.....	50
Manganeso.....	80

VITAMINAS (por Kg de pienso)

Vitamina A.....	10000	U.I.
-----------------	-------	------

Vitamina D3.....	2000	U.I
Vitamina E.....	15	mg
Vitamina K.....	1	mg
Vitamina B1.....	1	mg
Vitamina B2.....	3.5	mg
Vitamina B6.....	1	mg
Vitamina B12.....	15	µg
Acido fólico.....	0.3	mg
Biotina.....	15	µg
Acido nicotínico.....	30	mg
Pantotenato cálcico.....	10	mg
Colina.....	250	mg

Considerando las cifras convencionales de equivalencia calórica de los tres principios inmediatos (4.1 Kcal/g para los glúcidos y prótidos y 9.0 Kcal/g para los lípidos), la mezcla descrita posee un valor de 2.54 Kcal/g.

2.3. MODELOS DE SUBNUTRICION

2.3.1. Modelo de subnutrición en las ratas gestantes

El modelo de subnutrición consistió en una limitación de la cantidad de pienso suministrado diariamente a las ratas gestantes; en consecuencia, la subnutrición derivó de una deficiencia dietética proteico-energética. Dicha restricción cuantitativa se utilizó en todos los experimentos de este estudio.

Para establecer la pauta de subalimentación cuantitativa se calculó el alimento ingerido diariamente por las ratas preñadas alimentadas "ad libitum" y se suministró

a las gestantes subnutridas el 35% del valor obtenido en los controles.

Según este modelo se establecieron cuatro grupos experimentales (correspondiente a la primera parte del trabajo, apartado 3.1. de Resultados):

1) Ratas controles C

Animales gestantes alimentados "ad libitum" durante todo el periodo de gestación.

2) Ratas (0-7)

Animales gestantes subnutridos durante el primer tercio de la gestación, entre los días 0 y 7.

3) Ratas (7-14)

Animales gestantes subnutridos durante el segundo tercio de la gestación, entre los días 7 y 14.

4) Ratas (14-21)

Animales gestantes subnutridos durante el último tercio de la gestación, entre los días 14 y 21.

2.3.2. Modelo de subnutrición en las ratas adultas

En este modelo, la limitación se inició durante el último tercio de la gestación y continuó a lo largo de la lactancia y tras el destete. Por lo tanto, durante las dos primeras etapas mencionadas, la restricción se aplica a la madre y por ello la deficiencia nutricional en la rata feto y en la lactante fue indirecta, como resultado de la carencia materna; a partir del destete, una vez separadas las crías de la madre, la restricción se continua directamente en éstas.

La cantidad de pienso suministrada varió a lo largo de las tres etapas que se están considerando: gestación, lactancia y periodo posterior, concretándose en la

pauta esquematizada en la Fig. 1.

A lo largo del estudio se utilizaron los siguientes grupos de animales con la nomenclatura correspondiente expuesta a continuación:

A) Ratas controles C

Las ratas controles procedían de progenitores que siempre se alimentaron *ad libitum* con el pienso descrito. Las controles-lactantes fueron amamantadas por ratas que dispusieron libremente de pienso en todo momento; las controles-adultas recibieron dieta *ad libitum*.

B) Ratas subnutridas S

Animales que habían sido subnutridos durante las tres etapas consideradas: fetal, lactante y adulta.

C) Ratas subnutridas FL

Animales que habían sido subnutridos durante las etapas fetal y lactante y realimentados a partir del destete.

D) Ratas subnutridas F

Animales que habían sido subnutridos durante la etapa fetal y realimentados a partir del nacimiento.

E) Ratas subnutridas A

Animales alimentados *ad libitum* durante la etapa fetal y lactante y posteriormente subnutridos entre la 4ª y 8ª semana de vida.

2.4. TOMA DE MUESTRAS

Todos los animales fueron sacrificados entre las 10:00 y las 12:00 horas, cuando se encontraban en estado postabsortivo.

La sangre (mezcla arterial y venosa), fue obtenida directamente del cuello,

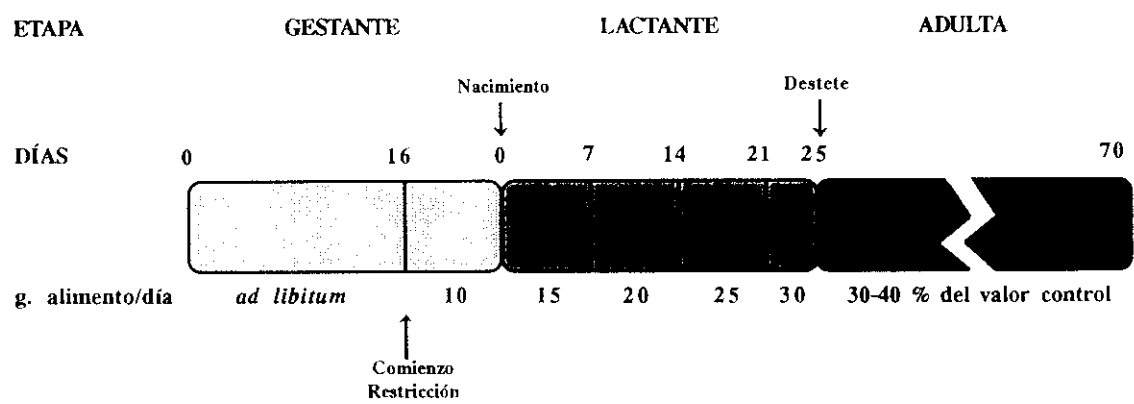


Fig. 1.- Esquema del modelo de subnutrición.

tras ser decapitada la rata. En el caso de los fetos, se le practicó a la madre una cesárea, bajo anestesia, y se obtuvo la sangre de la axila; se mantuvieron los fetos unidos a la placenta hasta el momento de la extracción, para intentar la toma en las condiciones más fisiológicas posibles. En estos últimos y en las ratas lactantes se mezcló la sangre de 2-3 animales para obtener suficiente cantidad de muestra.

Una vez recogida, la sangre fue tratada de distinta manera dependiendo del análisis posterior que se fuera a realizar:

1.- Para la determinación de la glucosa, la sangre se recogió en tubos fríos y heparinizados; posteriormente, fue desproteinizada con una mezcla, a partes iguales, de SO_4Zn 0.08M y $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0.08M (mezcla de Somogyi) y, a continuación, centrifugada durante cinco minutos a 2500 r.p.m. (en una centrífuga Beckman Microfuge 11). La glucosa se analizó en el sobrenadante que se obtuvo después de la centrifugación.

2.- Para la determinación de la insulina, la sangre fue recogida también en tubos fríos y heparinizados y se centrifugó de igual modo, a 2500 r.p.m., durante diez minutos. De esta manera se logró separar el plasma, que fue congelado a -20°C hasta el momento de valorar la insulina.

La obtención de los homogenados de páncreas se realizó según el método modificado de Best y col (1939). Para ello, las ratas fueron sacrificadas mediante un golpe en la cabeza y un posterior estiramiento de cervicales. La extracción se realizó tras la apertura de la cavidad abdominal y, una vez obtenida, fue rápidamente eliminada la grasa y pesado. El órgano, a continuación, se depositó en una mezcla de ácido-alcohol (75% de etanol, 1.5% de ácido clorhídrico 12N y 23.5% de agua destilada), en una proporción de 10 ml de la mezcla por gramo de páncreas. Posteriormente, se trocearon con unas tijeras romas y se homogeneizaron durante

dos minutos con un sonicador (Ultrasonic Power Unit M.S.E. England). Después de la sonicación, los homogenados de páncreas se guardaron a 4° C durante toda una noche. Al día siguiente, fueron centrifugados, a 2000 r.p.m. y a 4° C, durante diez minutos (en una ultracentrífuga Heraeus Minifuge T) y se recogió el sobrenadante para congelarlo a -20° C hasta la determinación de la insulina.

2.5. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.

El test de Tolerancia a la Glucosa es un método que nos permite medir la capacidad de los animales para metabolizar una sobrecarga de glucosa. Para ello se toman muestras de sangre donde se evalúan la glucemia e insulinemia a lo largo del periodo inmediatamente posterior a la administración de la glucosa.

Las ratas son anestesiadas, por vía intraperitoneal, con pentobarbital sódico (solución al 6%) a razón de 4mg/100g de peso y, seguidamente, se les pone al descubierto una de las venas safenas. En el caso de las madres gestantes, debido a la duración de la prueba, se les practica además una traqueotomía para no tener problemas respiratorios.

A los 30 minutos de ser anestesiadas, evitando así el efecto hiperglucemiante de la anestesia y el estrés quirúrgico (Penicaud et al, 1987), se toma una muestra de sangre del extremo de la cola para obtener los valores basales. A continuación, a las ratas adultas, tanto de 56 como de 70 días de vida, se les administra por vía safena una solución de glucosa al 25% a una dosis de 0,5 g/Kg de peso. A partir de entonces, las muestras de sangre se recogen cada 5 minutos durante media hora para su posterior análisis de la glucemia y la insulinemia. A las madres gestantes de 21 días, la dosis de glucosa que se les inyecta es de 2g/Kg de peso y las muestras se recogen a los 10, 15, 20, 30, 60 y 120 minutos de la sobrecarga.

2.5.1. Expresión de los resultados.

El efecto que la sobrecarga de glucosa tuvo sobre la glucemia y la insulinemia se expresa de tres formas distintas:

- 1.- Representando la evolución de ambos parámetros a lo largo de toda la prueba.
- 2.- Calculando las respuestas integradas de la glucosa (G) y de la insulina (I). Estas respuestas se definen como la suma de los incrementos de la glucemia e insulinemia, sobre los valores basales, a lo largo de un periodo de tiempo posterior a la administración de la glucosa (Okitolonda y cols., 1987). Se obtienen sustrayendo en cada tiempo de la prueba el dato basal y sumando a continuación los resultados.
- 3.- Calculando el índice insulinogénico (AI/AG) que se define como la relación entre la respuesta integrada de insulina y la respuesta integrada de glucosa (Kergoat y Portha, 1985). Este índice es una medida de la capacidad de respuesta insulino-secretora del páncreas frente a la carga de glucosa suministrada.

2.6. TECNICA PARA EL AISLAMIENTO E INCUBACION DE ISLOTES DE LANGERHANS.

2.6.1. Aislamiento de islotes en ratas adultas.

Para el aislamiento de los islotes de Langerhans y su posterior incubación se ha seguido el método descrito por Malaisse-Lagae y Malaisse (1984); dicha técnica permite valorar la influencia de agentes ambientales sobre la actividad secretora de las células beta pancreáticas *in vitro*.

El aislamiento de los islotes se realiza a partir de páncreas de ratas machos de 70 días de vida, utilizando de 2-5 páncreas por experimento.

Una vez sacrificados los animales, se procede a la apertura de la cavidad abdominal para localizar el páncreas y el conducto biliar. El extremo de este

conducto, más cercano al duodeno, se cierra; en el otro extremo, próximo al hígado, se inserta aproximadamente un centímetro de un catéter de poliestireno de 0.96mm de diámetro y se asegura en la zona con una ligadura. Dicho catéter se encuentra encajado en una jeringa de 10ml y, a través de él, se introducen de 15 a 20ml de una solución de Hanks [NaCl: 137mM; KCl: 5.36mM; NaHCO₃: 4.17mM; CaCl₂, 2 H₂O: 1.26mM; MgSO₄, 7 H₂O: 0.81mM; KH₂PO₄: 0.44mM; Na₂HPO₄, 2 H₂O: 0.34mM]. Esta inyección de líquido llena los principales conductos pancreáticos que abren al conducto biliar provocando una destrucción mecánica de la glándula exocrina. Una vez que el páncreas está bien hinchado, se libera del estómago, del duodeno, del bazo y de sus conexiones vasculares; posteriormente, se procede a su limpieza eliminando la grasa y los ganglios que puedan existir. Una vez obtenidos los páncreas, se cortan de forma mecánica con unas tijeras de punta roma hasta conseguir trozos de aproximadamente 1-2mm. Este proceso va a facilitar la posterior digestión del tejido.

La digestión se realiza en presencia de Colagenasa (Colagenasa P de *Clostridium Histoliticum*, actividad: 2U/mg; Boehringer) a razón de 5 mg de Colagenasa por páncreas. La mezcla de páncreas y Colagenasa se incuba durante 10 minutos a 37°C bajo corriente de carbógeno [95% O₂ / 5% CO₂], seguida de agitación manual. La digestión se interrumpe al realizar una dilución con medio Hanks. La preparación así obtenida se somete a una serie de lavados-sedimentaciones (de duración cada vez menor), cuyo objeto va a ser el de separar los islotes de la masa de tejido que sedimenta más lentamente. Finalmente, éstos son visualizados con una Lupa (Wild M38, Heerbrug) y pueden ser pescados de forma individual con la ayuda de una varilla de vidrio que presenta una curvatura en su extremo.

Tanto los lavados como la recuperación de los islotes se realiza en una

solución de Hanks.

2.6.2. Aislamiento y cultivo de islotes fetales.

Los islotes fetales se obtienen a partir de páncreas de fetos de 21 días de gestación y siguiendo la técnica descrita por Hellerström y cols. (1979). Con este método es posible aislar una gran cantidad de islotes fetales libres compuestos predominantemente por células beta.

Una vez sacrificada la madre, se extraen los fetos y se les separa de sus respectivas placentas. Se realiza la técnica con un número de fetos que oscila entre 12 y 24. Los páncreas obtenidos de los animales se depositan en un recipiente que contiene una solución de Hank esteril (Hank's balanced salt solution, ICN) y se limpian de los restos de bazo e intestino que puedan tener. Una vez limpios se colocan en un vial que contiene 4ml de Hank esteril y se añade la Colagenasa (Colagenasa P de Clostridium Histoliticum, actividad: 2U/mg; Boehringer Mannheim) a razón de 0.28mg por páncreas.

La digestión se realiza durante 10 minutos a 37°C en baño maría con agitación, seguida de agitación manual. El Hank estéril lleva adicionado Rojo de Fenol, indicador que sufre un pequeño cambio de color cuando la digestión ha finalizado. A partir de ese momento el proceso se realiza en cámara de flujo laminar (Telstar, S.A. Tessana, España). Una vez lavada la preparación con Hank estéril se le añade medio de cultivo (RPMI-1640, ICN al que se adiciona L-glutamina - Glutamine 200mM, ICN- y antibióticos -Penicillim and Streptomycin, ICN-) y suero de vaca fetal (Heat inactivated foetal bovine serum sterile, ICN) y se introduce en las placas de cultivo (tissue culure multiwell plate with cover, ICN). Se mantienen a 37°C y con una atmósfera de 5% de CO₂ (cámara Haereus) de 5 a 7 días. El

cambio de medio se realiza cada dos días, con lupa (Wild M38, Heerbrug), para evitar arrastrar los islotes, y en cámara de flujo laminar.

Después de un día de cultivo, la masa de células y los fragmentos de tejido se van depositando en el fondo de la placa y los islotes se pueden distinguir tanto aislados como rodeados de células acinares. Entre los días 2 y 4 las células exocrinas van desapareciendo gradualmente y proliferan un gran número de células similares a fibroblastos que forman una monocapa en el fondo de la placa de cultivo. Al final del periodo de cultivo, la parte acinar desaparece por completo y sólo se observan los islotes y la capa de células similares a fibroblastos.

Los islotes aislados con esta técnica parecen representar un rango de tallas con predominancia de islotes pequeños, lo cual es similar a la situación *in vivo* (Hellertröm, 1977). Después del periodo de cultivo los islotes están preparados para su incubación estática.

2.6.3. Incubación estática de los Islotes.

La incubación de los Islotes ha de realizarse inmediatamente después de que éstos sean pescados.

Grupos de 6 ó 7 islotes son colocados en pocillos (de 1cm de diámetro y 2-3cm de alto) que contienen 1ml de medio de incubación; estos pocillos, a su vez, son introducidos en viales de centelleo e incubados en un baño con agitación a 37°C durante un periodo de 90 minutos. Durante los cinco primeros minutos de la incubación los viales son gasificados con gas carbógeno. El medio de incubación consiste en una solución tampón-bicarbonato [NaCl: 115mM; NaHCO₃: 24mM; KCl: 5mM; MgCl₂, 6 H₂O: 1mM; CaCl₂, 2 H₂O: 1mM;] (medio Krebs) que contiene albúmina bovina (5 mg/ml; Fracción V; SIGMA). Al medio se adicionan los

distintos secretagogos a evaluar:

- 1) Glucosa 2.8mM
- 2) Glucosa 2.8mM + 19mM de Arginina
- 3) Glucosa 16.7mM
- 4) Glucosa 16.7mM + 19mM de Arginina
- 5) Leucina 10mM

Después de la incubación, el sobrenadante, que contiene la insulina liberada, es recuperado de los pocillos con una pipeta Pasteur. Este procedimiento ha de realizarse bajo la Lupa para evitar arrastrar algún Islote. El sobrenadante así obtenido es entonces conservado a -20° C hasta el momento en el que se valore la cantidad de Insulina liberada por los Islotes.

2.6.4. Extracción de la Insulina de los Islotes.

Para valorar el contenido de insulina que existía en los Islotes, se recogieron grupos de 20 Islotes en 0.5 ml de una mezcla ácido-alcohol (75% de etanol, 1.5% de ácido clorhídrico 12N y 23.5% de agua destilada). Una vez recopilados, fueron homogeneizados y posteriormente sonicados (en un sonicador Ultrasonic Power Unit M.S.E. England), lo que produjo la ruptura de las células con la consecuente liberación de la insulina contenida en los islotes. El extracto que se obtuvo se conservó a -20° C hasta su valoración.

2.7. ESTUDIOS HISTOLOGICOS.

Para marcar las células beta pancreáticas, utilizamos el método de marcaje indirecto de la inmunoperoxidasa. El marcaje se realiza sobre los cortes de páncreas previamente fijados e incluidos de forma clásica.

2.7.1. Fijación.

Después de la extracción de los páncreas, se lavan y se pesan e inmediatamente son fijados en líquido de Bonin (ácido pícrico a saturación, formol y ácido acético) durante 24 horas. Posteriormente, se deshidratan con baños sucesivos en alcohol y son aclarados con tolueno para su inclusión dentro de la parafina.

2.7.2. Corte.

Los bloques de parafina que contienen los páncreas son cortados con un microtomo (Leitz 1515) en cortes seriados de 7 μ m de espesor.

Después de ser secados durante 24 horas en estufa a 45°C, los cortes son marcados para la inmunohistoquímica.

2.7.3. Marcaje inmunocitoquímico.

Principio

La inmunohistoquímica consiste en la identificación "in situ" de constituyentes tisulares a través de una reacción antígeno-anticuerpo específica. Los métodos más utilizados son las técnicas indirectas en dos o más tiempos. En nuestro caso hemos utilizado la técnica indirecta en dos tiempos descrita por Avrameas y Ternynck (1971) y Michel y cols. (1982), donde el segundo anticuerpo es marcado por la peroxidasa.

Etapas de la reacción

1.- Los cortes son desparafinados y rehidratados con agua destilada. El conjunto de las diluciones y lavados se realizan en tampón Tris/HCl (0.05M, pH=7.6) adicionado con NaCl 9%.

2.- Bloqueo de las peroxidasas endógenas.

La presencia de peroxidasas endógenas en el tejido de estudio puede conducir a una reacción coloreada idéntica a la que tiene lugar en la etapa final del marcaje cuando las peroxidasas se fijan al segundo anticuerpo. Para evitar la aparición de la coloración por los sitios no específicos, es necesario el bloqueo de las peroxidasas endógenas antes del marcaje. Para ello, las láminas son colocadas en una solución de H_2O_2 a 0.3% en tampón Tris durante 30 minutos.

3.- Lavados con tampón Tris.

4.- Atenuación del ruido de fondo.

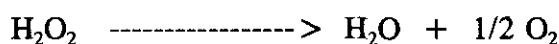
Esta etapa se realiza para evitar cualquier reacción no específica que pudiera producirse entre las proteínas tisulares y los anticuerpos utilizados. Se aplica suero de cabra normal (UCB Bioproducts Ref. 200-002) sobre los cortes en los que previamente se ha escrito con un rotulador especial (Dakopen, Dako, Ref. S2002) a fin de limitar la superficie de difusión del suero depositado. La duración de la incubación es de 30 minutos.

5.- Marcaje con el anticuerpo anti-insulina.

Se incuba con un anticuerpo anti-insulina de cobaya (ICN, Ref. 65-104) (dilución 1/500) durante una hora.

6.- Lavados con tampón Tris.

Se incuba con los anticuerpos anti IgG de cobaya unidos a peroxidasa (Dako, Ref. P141) (dilución 1/50) durante una hora. La peroxidasa cataliza la reacción de hidrólisis del agua oxigenada:



El oxígeno liberado oxida la molécula diamino benzidina (DAB) (Sigma, Ref. D-5905) lo que provocará una coloración parda. Esta reacción permite localizar en

los cortes las células que contienen insulina.

- Se añaden 10 mg de DAB disuelta en 20 ml de tampón Tris.
- Añadir 12 gotas de H_2O_2 al 3%.
- Aplicar esta solución a los cortes.
- Controlar el desarrollo de la reacción de coloración al microscopio.
- Detener la reacción al lavar los cortes con agua destilada.

7.- Coloración complementaria de los núcleos con hematoxilina de Harris (Gurr, BDH, Ref. 35031).

8.- Montaje de las láminas.

Las láminas son deshidratadas, aclaradas y montadas con un medio sintético Eukitt (Kindler).

2.8. CUANTIFICACION DE CELULAS B.

2.8.1. Principio del método estereológico utilizado para estimar la masa de células B pancreáticas.

La cuantificación de la masa de células beta presente en los páncreas se ha realizado aplicando los métodos de la estereología. Este método, fundado en modelos matemáticos y estadísticos permite transformar informaciones parciales provenientes de secciones o proyecciones de un espacio de dos dimensiones en parámetros de tres dimensiones. Estos parámetros representan la relación de volumen ocupado por las partículas con respecto al volumen del espacio de referencia. Según la nomenclatura de los parámetros estereológicos, el volumen total de células beta relacionado con el total de células del tejido pancreático, se denomina proporción de volumen y se representa por la notación V_v .

El método de medición del porcentaje de volumen se fundamenta en el

siguiente postulado: si en un espacio de referencia en tres dimensiones un corte tiene una orientación al azar, la relación entre el volumen ocupado por las partículas y el volumen del espacio de referencia es igual a la relación de la superficie de sección de estas partículas en el espacio en dos dimensiones (llamado Aa). En efecto, el empleo de la superficie de sección permite la reconstrucción del volumen. Por tanto, la medida de la proporción de volumen se simplifica midiendo la superficie de sección (es decir $V_v = A_a$).

2.8.2. Medición de la superficie de sección relativa (Aa) y de la proporción volumínica (Vv) de las células B.

La medición de la superficie de sección (Aa) se efectúa por planimetría electrónica con la ayuda de un sistema de análisis de imagen BIOCOM (Imagenia 2000).

El análisis de la imagen necesita la intervención de tres sistemas:

- 1.- Un sistema de entrada-salida que permite la adquisición, el almacenamiento y la recuperación de imágenes en una pantalla de video.
- 2.- Un sistema de tratamiento de imágenes que permite determinar los umbrales específicos de la imagen en función de los niveles de gris exhibidos por las diferentes partes del corte.
- 3.- Un sistema de tratamiento de imágenes que permite traducir las características de la imagen en parámetros.

En los cortes estudiados, la diferencia de tinción entre las células beta, coloreadas en sepia por la reacción de la inmunoperoxidasa, y el resto de tejido pancreático, coloreado en azul por la hematoxilina de Harris, es transformado por el analizador en diferentes densidades de gris.

Para cada corte se mide la superficie de tejido pancreático total (A_p) y la superficie de tejido endocrino (A_B). Conociendo la masa de tejido pancreático total (m), la masa de células beta por páncreas se puede calcular como:

$$A_B/A_p \times m$$

2.8.3. Muestreo de los cortes a cuantificar.

Debido al gran número de cortes de $7\mu m$ de espesor que se obtienen a partir de una muestra, la cuantificación de las células beta se realiza en una subpoblación de cortes que debe ser representativa del total del páncreas. Para ello, se efectúa un muestreo al azar cuyo principio es el siguiente: para una muestra con un total de "M" cortes se decide escoger "m" cortes para analizar. La probabilidad de que el muestreo "m" sea representativa del total "M" será m/M . Sea P la inversa de esta probabilidad. P representa el intervalo necesario y suficiente entre los cortes para que las muestras medidas sean representativas del total de los cortes.

Con la ayuda de una tabla de números aleatorios se escoge el número del primer corte (C) que va a constituir la muestra. Los otros cortes seleccionados serán por tanto los números $C + P$, $C + 2P$, $C + 3P$,...

2.9. DETERMINACION DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA.

FUNDAMENTO

Para la determinación de los transportadores de glucosa (GLUTs) se empleó la técnica de "Western Ligant Blott". Es esta una técnica que requiere varios procesos: en primer lugar, se realiza la electroforesis en gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970) para separar los GLUTs y el resto de las proteínas; posteriormente, se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa; finalmente, se incuba

la membrana con anticuerpos específicos contra los GLUTs y se visualizan mediante una reacción inmunoquímica.

PROTOCOLO

1.- Obtención de las muestras.

Los islotes donde se determinan los GLUTs se recogen en seco (300-500 islotes), y se congelan con nitrógeno líquido a -80°C hasta su utilización.

El día de la prueba se resuspenden en tampón de lisis (Tris, 80mM; EDTA, 5mM; PMSF, 1mM y Glicerol al 10%; pH 6.8) y se sonicán durante un minuto. En estos homogenados se miden las proteínas y, una vez determinadas, se les añade SDS (concentración final: 3%) y beta-mercaptoetanol (concentración final: 5%). A continuación se incluye como indicador azul de Bromofenol al 0.005% y se deja durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de cargar el gel.

2.- Electroforesis.

Preparación de los geles de poliacrilamida

Se preparan dos geles de diferente concentración final de acrilamida: una, al 5% (Tris, 0.5M; SDS al 10%; Acrilamida al 30%; Persulfato amónico al 10% y Temed) denominado "concentrador", donde se localizan los pocillos en los que se depositan las muestras; otra, al 10% (Tris, 1.5M; SDS al 10%; Acrilamida al 30%; Persulfato amónico al 10% y Temed) denominado "separador", donde se depositan las proteínas que migran a través de él. El Temed debe añadirse antes de cargar el gel, ya que actúa como catalizador de la gelificación. En primer lugar se prepara el "separador" y una vez gelificado se introduce el "concentrador". Finalmente, con ayuda de un peine, se moldean los pocillos de las muestras en el "concentrador".

Carga de las muestras

Las muestras, con un volumen tal que contenga la cantidad de proteínas que queremos cargar (30 μ g para el GLUT-2, 60 μ g para el GLUT-1 en ratas adultas y 20 μ g para GLUT-1 en fetos), se depositan en los pocillos.

Aparte de las muestras, se carga una proteína teñida de peso molecular similar al de las proteínas-problema lo que permite reconocer dónde se localizan. En nuestro caso, usamos fumarasa de peso molecular 48500 (Fumarasa F-0262, Sigma).

Por último, como control positivo, se deposita una preparación de membranas que contienen GLUT-1 y GLUT-2 como referencia para identificarlos. En el caso del GLUT-2, la preparación se realiza con membranas de hígado y para el GLUT-1, con membranas de cerebro. En las figuras 2 y 3 aparecen los resultados que se obtuvieron al efectuar una curva patrón con cantidades crecientes de ambas preparaciones en la puesta a punto de la técnica.

Las preparaciones de membranas se obtienen mediante centrifugación diferencial del tejido previamente homogenado.

Condiciones de la electroforesis

El gel se carga en el aparato de electroforesis y se cubre con un tampón de electroforesis (Glicina, Tris y SDS al 10%). El proceso se realiza a 125V, 500mA y durante aproximadamente una hora y media.

3.- Electrotransferencia.

Transcurrida la electroforesis, se recupera el gel y se deposita en un tampón de transferencia compuesto de Tris, Glicina y Metanol. La membrana donde se transfiere (Inmobilon-P; Millipore) se sumerge durante 30 segundos en metanol y 60 segundos en agua. Se prepara el conjunto gel-membrana y se introduce en la cubeta de electrotransferencia, rellena de tampón. La transferencia se realiza en frío y con

GLUT-1

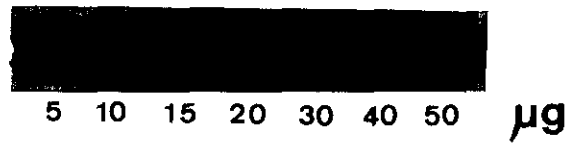
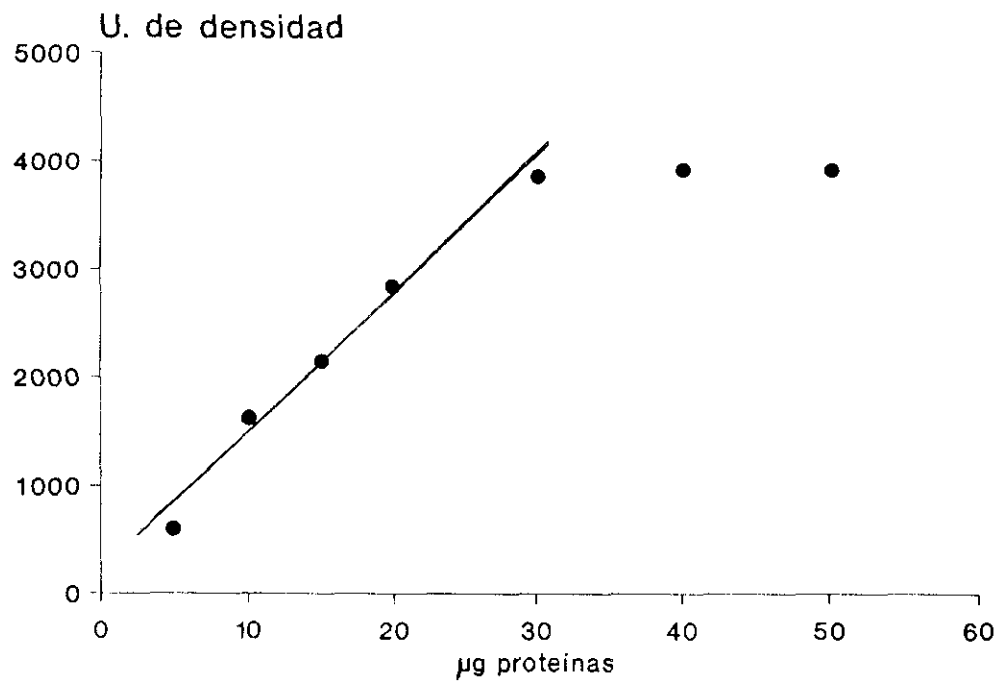


Fig. 2.- Curva patrón de GLUT-1 realizada con concentraciones crecientes de proteínas presentes en membranas de cerebro.

GLUT-2

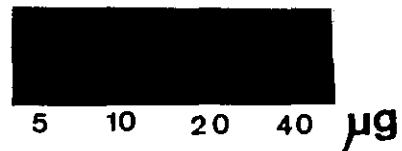
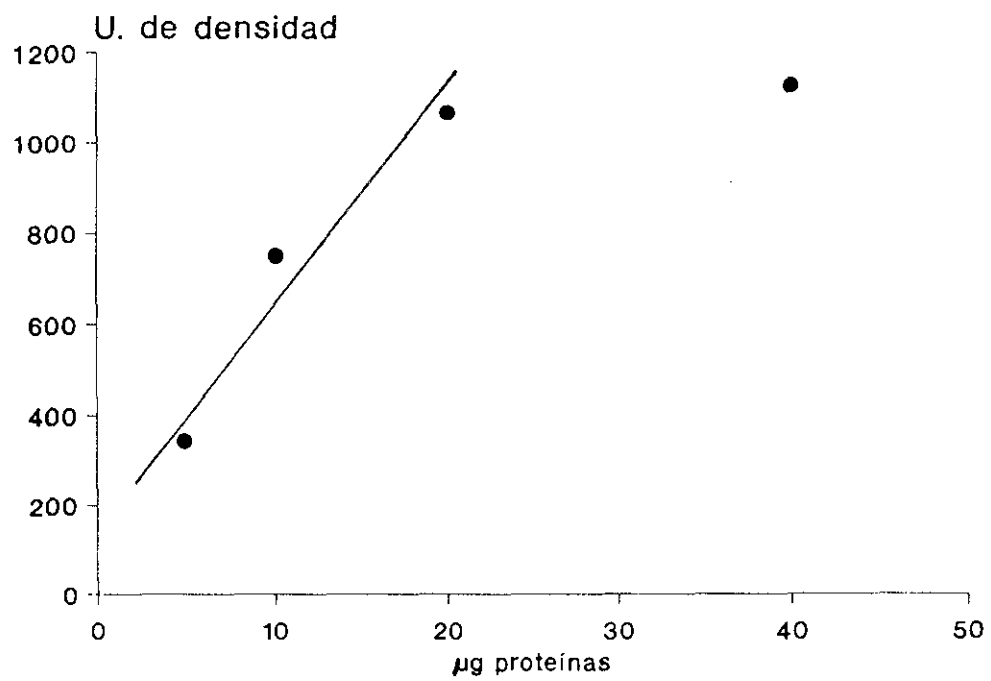


Fig. 3.- Curva patrón de GLUT-2 realizada con concentraciones crecientes de proteínas presentes en membranas de hígado.

agitación, durante dos horas y media a 100V y 300mA.

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas han pasado del gel a la membrana.

4.- Incubación de los anticuerpos.

Bloqueo de las proteínas

Antes de incubar la membrana con el anticuerpo primario, se han de bloquear los sitios de unión libres de la misma, sumergiendo la membrana en una solución de bloqueo (leche al 5% en PBS) que contiene una alta concentración de proteínas.

Tratamiento con el primer anticuerpo

Se utilizan anticuerpos contra GLUT-1 (Policlonal antibody to glucose transporter -rat brain-, Biogénesis) y GLUT-2 (Policlonal antibody to glucose transporter2, Biogénesis) disueltos en PBS con BSA al 3% y azida sódica al 0.02%.

Para el tratamiento con el anticuerpo, la membrana se introduce en una bolsa de plástico con el anticuerpo, se sella por completo y se agita toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, se introduce la membrana en solución lavadora (Tween-20 al 0.1% en PBS), se coloca en un baño a 37°C con agitación durante 10 minutos, se cambia la solución lavadora y se repite el proceso hasta cuatro veces.

Tratamiento con el segundo anticuerpo

Se prepara el segundo anticuerpo diluido en leche al 1% en PBS y Tween-20 al 0.05% en PBS. Se introduce la membrana en una bolsa de plástico con la dilución de segundo anticuerpo y se agita a temperatura ambiente durante una hora. Después del tratamiento, se lava nuevamente con solución lavadora hasta cuatro veces.

5.- Reconocimiento de los complejos específicos.

Se llevó a cabo mediante una técnica quimioluminiscente, la técnica de ECL.

El anticuerpo secundario se encuentra unido a una enzima que es capaz de

catalizar la oxidación de un perácido, la peroxidasa de rabano (HPR). La forma oxidada de este perácido excita al luminol que pasa así a un estado capaz de emitir luz. De esta forma, la luz aparece en la zona donde se localizan los GLUTs.

Se prepara una mezcla a partes iguales de los reactivos "Detection reagent 1 y 2" (ECL Westerm blotting protocols. RPN 2106; Amersham). En cámara oscura, se sumerge la membrana en esta mezcla durante 30-60 segundos. La membrana se envuelve en plástico flexible para que esté bien seco externamente y se fija a una película sensible. La duración del contacto depende de la intensidad luminosa de las señales.

Finalmente la película se revela en un revelador automático Agfa Curix 60.

6.- Cuantificación densitométrica.

La densidad óptica de las manchas presentes en la película se cuantifica en un densitómetro personal de Molecular Dynamics (Sumyvale, California).

2.10. TECNICAS ANALITICAS

2.10.1. Determinación de la glucosa en sangre.

La glucosa se analizó en la sangre por el método de la glucosa-oxidasa (Test-Combination Glucose, Boehringer).

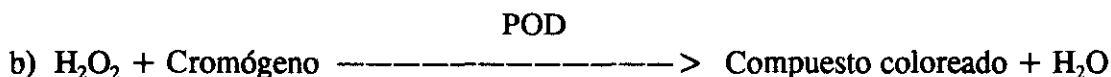
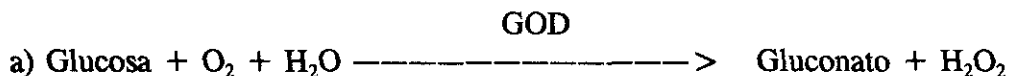
Principio

En una primera fase, la glucosa es oxidada a gluconato mediante la enzima glucosa-oxidasa (GOD, EC 1.1.3.4), en una reacción que libera agua oxigenada.

En una segunda fase, la enzima peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7.) (213) cataliza, por medio del agua oxigenada, la oxidación de un compuesto reducido. Dicho compuesto, el cromógeno 2,2'azino-di [3 etil benzotiazolina-ácido sulfónico (6)] sal diamónica, es capaz de colorearse al ser oxidado, presentando un máximo

de absorbancia(A) a 420 nm.

La pauta reactiva es la siguiente:



Protocolo

La sangre se desproteiniza y trata según se describió en la sección 2.4. Del sobrenadante obtenido, se toman 100 μl y se añaden 2.5 ml de GOD. La reacción se lleva a cabo durante 35 minutos en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, la medición de la Absorbancia se realiza en un espectrofotómetro.

La Absorbancia evaluada es directamente proporcional a la concentración de glucosa y se compara con la que se obtiene con una solución patrón de ésta (9.1 mg/ml). De esta forma, el cálculo de la concentración sanguínea de glucosa se realiza a partir de la expresión:

$$\frac{A_{\text{problema}}}{A_{\text{patrón}}} \times 100 = \text{mg glucosa}/100 \text{ ml sangre}$$

2.10.2. Determinación de las proteínas.

El análisis de las proteínas se llevó a cabo mediante el método descrito por Bradford (1976). El principio de este método se basa en el cambio de absorbancia que experimenta una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250 (465nm) cuando se une a proteínas (595nm).

Se prepara una curva patrón a partir de una solución de gamma-globulina de concentración 1mg/ml (gamma-globulina, SIGMA G5009). A la curva estándar y los

problemas a dosificar se les añade 1ml de reactivo de coloración (Bio Rad Protein Assay, Cat- 500-0006, diluido 1/5 con agua y filtrado). Una vez añadido el reactivo, se agitan los tubos y se mantienen 5 minutos en oscuridad. Pasado este tiempo de incubación, se lee la absorbancia a 595nm. Las concentraciones problemas se resuelven sobre la curva patrón.

2.10.3. Determinación radioinmunológica de Insulina.

Esta técnica fue introducida por Yalow y Berson (1960) para medir la insulina plasmática y es actualmente utilizada para valorar, de manera sensible y reproducible, un gran número de hormonas, enzimas o medicamentos.

Principio

El radioinmunoanálisis (RIA) está basado en:

A) La competición de la insulina no marcada (fría) y la insulina marcada con un isótopo radiactivo (I^{125}) por los mismos espacios antigénicos de un anticuerpo anti-insulina (Ac).

B) La separación de la hormona libre (F) del complejo insulina-Anticuerpo anti-insulina (B).

Se ponen cantidades constantes de insulina radiactiva y de Ac-anti-insulina en presencia de cantidades variables de insulina fría (cantidades conocidas en los estandares que sirven para establecer una curva patrón y cantidades a determinar en las muestras a dosificar). La hormona fría compite con la hormona marcada en su reacción con el anticuerpo específico, evitando la formación del complejo Ac-Antígeno marcado y favoreciendo el complejo Ac-Antígeno no marcado. Por tanto, una vez que se alcanza el equilibrio de unión, la proporción de insulina libre (F) será función de la cantidad de insulina fría presente en el medio. Es decir, cuanta más

hormona marcada libre (F) haya, más cantidad de hormona fría existirá en el medio.

Finalmente, la concentración de insulina de las muestras se calcula comparando su reactividad inmunológica con la de las soluciones estándares que contienen cantidades conocidas de hormona.

El isótopo utilizado es el I^{125} puesto que es relativamente fácil de introducir en las hormonas peptídicas. Este isótopo presenta una actividad específica elevada, necesaria para las clasificaciones radioinmunológicas sensibles, y se mide fácilmente gracias a los rayos gamma que emite.

Reactivos

Se emplea el Kit suministrado por la casa Novo Nordisk, utilizándose los siguientes reactivos.

1.- Tampón FAM [Na_2HPO_4 , H_2O ; NaH_2PO_4 , H_2O ; albúmina bovina; metiolato].

El FAM es un tampón fosfato 0.04M, pH 7.4, utilizado para diluir el anticuerpo anti-insulina de suero y la insulina marcada con I^{125} .

2.- Tampón FAM-Na [FAM; albúmina humana; NaCl].

El FAM-Na es un tampón fosfato 0.04M, pH 7.3, que contiene NaCl. Se emplea para la preparación de la solución estándar y para diluir las muestras de suero.

3.- Solución de insulina marcada.

Se utiliza insulina humana moniodada liofilizada, marcada con I^{125} . Se reconstituye en 1.4 ml de agua destilada. Una alícuota de esta solución se diluye en FAM de forma que cada tubo de dosificación contenga 100 μ l de solución de insulina marcada.

4.- Solución estándar de insulina.

Se utiliza insulina de rata purificada y liofilizada que se reconstituye con 1.4 ml de agua destilada. A partir de esta solución se obtiene, por sucesivas diluciones con FAM-Na, la curva patrón.

5.- Solución de anticuerpos.

Se emplea un anticuerpo anti-insulina de cobaya, liofilizado y reconstituido con 1.4 ml de agua destilada. Esta solución se diluye con FAM para obtener una solución de anticuerpos para el inmunoanálisis.

Dilución de las muestras.

Debido a la gran cantidad de hormona que presentan, algunas de las muestras problema hay que diluirlas para que puedan ser leídas en la curva patrón.

En el caso de los plasmas, la dilución se realiza con FAM-Na mientras que en el resto de las muestras las diluciones se realizan con Medio Krebs + albúmina.

Protocolo

Componentes del RIA

a) La curva estándar.

Tubos que contienen cantidades crecientes de hormona fría frente a una misma cantidad de hormona marcada.

b) Los ceros.

Tubos que no contienen hormona fría y, por tanto, indican la radiactividad máxima ligada por el anticuerpo.

c) Los blancos.

Tubos que no contienen antisuero ni hormona fría; miden la ligazón inespecífica que debe restarse al resto de los tubos.

d) Los estándares de contaje.

Tubos que indican la radiactividad que se pone en forma de hormona marcada.

e) Los tubos problema.

Tubos que contienen las muestras a determinar.

Desarrollo de la reacción.

a) Adición del anticuerpo.

Se añaden a cada tubo 100 μ l de la solución de anticuerpos obtenida y se incuba durante un periodo de 20-24 horas a 4°C. La hormona fría ocupará una parte de los sitios de unión del antisuero y dejará otra parte libre.

b) Adición de la insulina marcada.

Después de la incubación con el anticuerpo, se añaden 100 μ l de hormona marcada y se incuba durante 4 horas a 4°C. La hormona marcada ocupará los lugares que permanecían libres.

c) Separación del complejo antígeno-anticuerpo.

Para separar el complejo antígeno-anticuerpo de la hormona libre, se añaden 1.6 ml de etanol al 96% y se centrifuga durante 10 minutos a 2000 r.p.m. De esta forma, se consigue que el complejo precipite.

Una vez precipitado el complejo, se elimina el sobrenadante y se procede a lavar con una mezcla de etanol 96%, FAM y agua destilada. Se centrifuga durante otros 10 minutos a 2000 r.p.m. y se elimina el sobrenadante.

Finalmente, se redisuelve el precipitado en 0.5 ml de NaOH 0.05N y se cuenta la radiactividad en un contador Packard Auto-Gamma 5650.

Cálculos

Después del recuento en cada tubo de la radiactividad (cuentas por minuto, c.p.m.), se calcula el "porcentaje de radiactividad ligado específicamente", *RPB*, cuya expresión es:

$$RPB = \frac{Ci - Cb}{Co - Cb} \times 100$$

en donde *Ci* es la radiactividad precipitada en un tubo dado, *Co* la precipitada en los tubos "ceros" y *Cb* la precipitada en los "blancos".

A continuación, se traza una curva patrón en la que se representa en las abscisas las concentraciones estándar de hormona fría y en las ordenadas, el *RPB* correspondiente. La curva que se obtiene de esta manera es parabólica. Si lo que representamos es el *RPB* en función del logaritmo de la concentración, la curva que aparece tiene carácter sigmoideo. Los tubos problema se resuelven en el tramo lineal de esta última gráfica; para ello se calcula la recta de regresión lineal y se sustituyen en ella los valores de radiactividad obtenidos en cada problema.

De esta forma, se puede determinar la concentración de hormona fría para cada muestra problema.

Debido a la no comercialización del Kit de insulina de la casa NOVO a partir del año 1994, parte de los resultados que componen esta Tesis se han evaluado con otro Kit comercial suministrado por la casa INCSTAR Corporation (Stillwater, Minnesota, USA).

Los reactivos de este nuevo Kit incluyen:

- Insulina porcina marcada con I^{125} .
- Solución estandar de insulina de rata para la obtención de la curva patrón.
- Anticuerpos anti-insulina de cobaya.

-Complejo de precipitación.

La dilución de las muestras, los componentes del RIA y el desarrollo de la reacción fueron similares a lo descrito para el Kit de la casa NOVO. Se adaptó la curva patrón al mismo rango que utilizábamos y, valorando los mismos problemas con los dos tipos de RIA, comprobamos que no existían diferencias significativas en los resultados obtenidos con una u otra prueba. Hay que reseñar que el análisis comparativo de los métodos nos confirmó la absoluta posibilidad de comparación de resultados en afinidad y sensibilidad en ambos métodos (Fig. 4).

2.10.4. Determinación fluorimétrica del DNA

La técnica utilizada para la medición del DNA fue descrita en 1980 por Labarca y Paigen (Labarca et Paigen, 1980) y modificada posteriormente por Hopcroft y cols. (1985).

Principio

Se trata de una dosificación fluorimétrica. El fluorocromo utilizado es el compuesto Hoechst 33258, molécula que tiene la propiedad de intercalarse entre las bases de la doble hélice de ADN y aumentar de esta forma su fluorescencia.

Este método permite utilizar directamente los homogenados ya que en ellos la estructura proteica de la cromatina está dissociada y hace al ADN accesible a la reacción. En estas condiciones, el aumento de la fluorescencia del compuesto H33258 es lineal con respecto al incremento en la concentración de ADN.

En nuestro caso, los homogenados se realizaron a partir de islotes congelados a -20°C que son sonificados en el momento de la valoración.

Reactivos

1.- Solución alfa.- (NaCl 2M / Na₂HPO₄ 50mM).

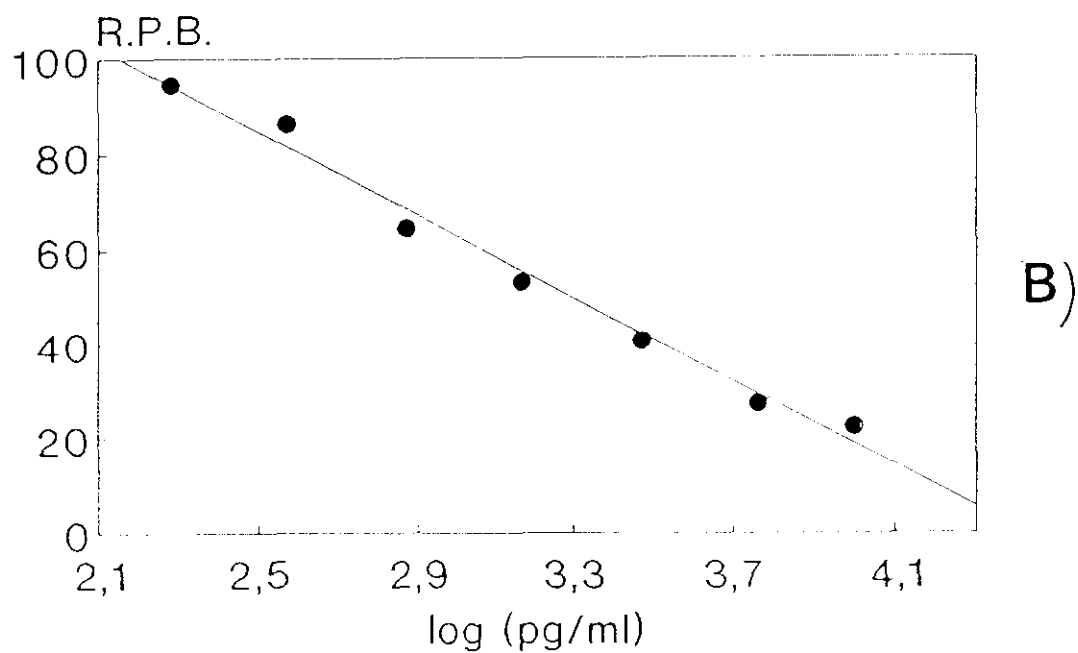
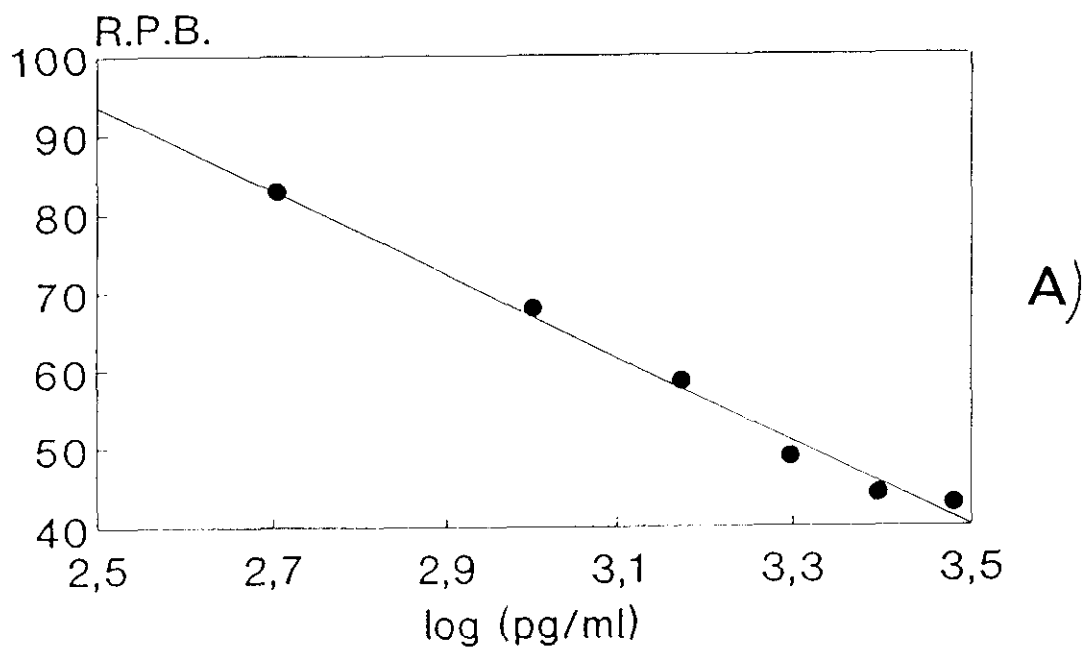


Fig. 4.- A) Curva patrón del RIA comercial de insulina suministrado por la casa NOVO.
 B) Curva patrón del RIA comercial de insulina suministrado por la casa INCSTAR.

2.- Solución beta.- (NaCl 2M / NaH₂PO₄ 50mM).

La solución alfa (básica) junto con la solución beta (ácida), ajustadas a pH 7,4, forman el tampón de dosificación.

3.- Fluorocromo Hoechst 33258 (Sigma, Ref B2883).

Se prepara una solución de fluorocromo de concentración 0,1 µg/ml.

4.- ADN de timo de ternera (Sigma, Ref. D1501).

Se prepara una solución madre de ADN de concentración teórica 500 µgADN/ml. La concentración real de la solución se determina al medir la absorción, a 260 nm, de la solución de ADN diluida 1/10 con tampón de dosificación. Una unidad de absorbancia se obtiene para una solución de 50 µgADN/ml.

Protocolo

1.- Preparación de la curva patrón de ADN.

A partir de la solución madre de ADN se prepara una curva con cantidades crecientes de ADN, hasta un volumen total de 1425 µl.

2.- Tratamiento de los problemas.

A cada grupo de islotes guardados en seco, se le añade 1425 µl de tampón de dosificación y se sonicán durante 15 segundos a 2 Amperios en tres pulsos de 5 segundos.

3.- Adición del fluorocromo.

A todos los tubos de la curva estándar y a los problemas se les añaden 75 µl de la solución diluida de fluorocromo, para llegar hasta un volumen final de 1500 µl. Se agitan los tubos y se dejan en oscuridad durante media hora.

4.- Medición de la intensidad de fluorescencia.

La intensidad de fluorescencia relativa fue medida en un fluorímetro (Luminiscence Spectrometer LS 50, Perkin Elmer) a una longitud de excitación de

356nm y de emisión de 448nm.

Cálculos

Se traza una curva patrón en la que se representa en las abcisas la concentración de ADN y en las ordenadas la fluorescencia (Fig. 5). Se calcula la recta de regresión lineal y la cantidad de ADN de las muestras se calcula sustituyendo en ella los valores de fluorescencia obtenidos en cada problema.

De esta forma, se determina la concentración de ADN de cada muestra problema y se divide entre el número de islotes que contiene.

2.11. EXPRESION DE LOS RESULTADOS Y CALCULOS ESTADISTICOS

Los resultados obtenidos se han expresado como la media aritmética de cada serie de valores y su desviación estándar (D.S) o su error estándar (E.S). Las fórmulas correspondientes a estos dos últimos parámetros son:

$$D.S. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad E.S. = \frac{D.S.}{\sqrt{n}}$$

x_i es cada valor encontrado, \bar{x} es la media aritmética y n el número total de datos.

En las series en que se dispuso de un número elevado de datos, pudieron rechazarse los que se encontraron sensiblemente alejados de la media, mediante la aplicación del test de la χ^2 . Para ello se determinó en las tablas el valor de χ^2 en función del número total de valores y del número de éstos que caían fuera del intervalo definido por la media y la desviación estándar:

Si se despreciaba algún dato, se repetía el cálculo de la media aritmética y

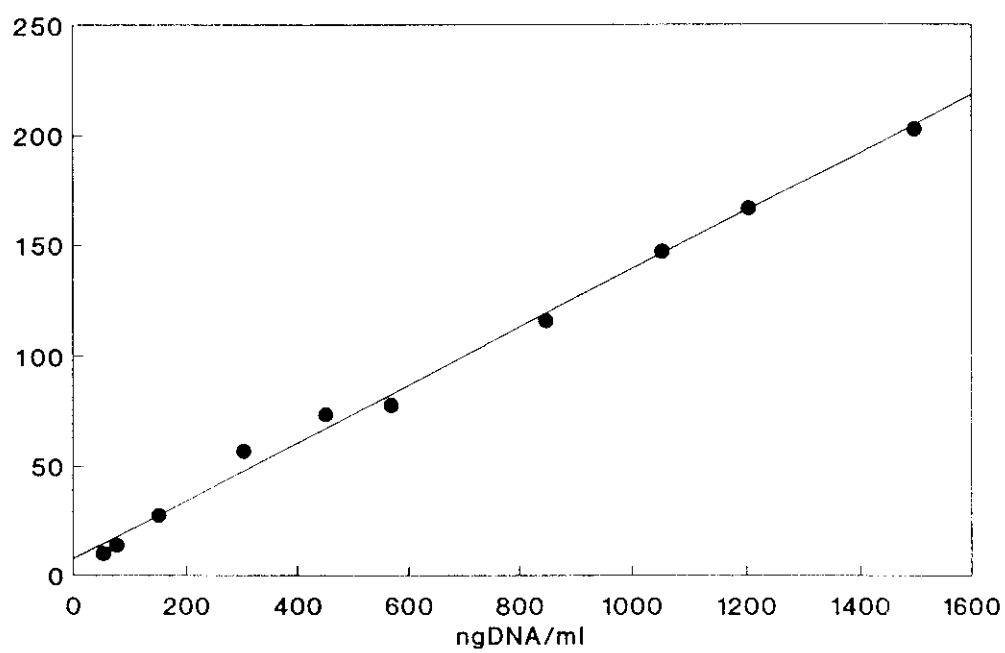


Fig. 5.- *Curva patrón de ADN.*

$$\bar{x} \pm \sqrt{\chi^2 \sum_{i=1}^{i=n} \left(\frac{\bar{x} - x_i}{n-1} \right)^2}$$

la desviación o el error estándar sin ellos.

Para determinar el grado de significación estadística de la diferencia dos medias, se utilizó la "t" de Student, calculada mediante la expresión:

$$t = \frac{\sqrt{\frac{n_x \cdot n_y}{n_x + n_y} (\bar{x} - \bar{y})}}{\sqrt{\frac{D_x^2 \cdot n_x + D_y^2 \cdot n_y}{n_x + n_y - 2}}}$$

en la cual \bar{x} y \bar{y} son las medias aritméticas que se comparan; n_x , n_y el número de valores de cada serie; D_x , D_y son las respectivas desviaciones estándar no sesgadas.

Una vez calculado el valor de t , se obtuvo el grado de significación de la diferencia en la correspondiente tabla. En los casos en los que se pudo, se determinó el grado de significación estadística de la diferencia entre medias por medio del análisis de la varianza (ANOVA). Éste cálculo se realizó con el programa BMDP (BMDP Statistical, Software Inc. Los Angeles).

El grado de significación es una medida de la probabilidad de que la diferencia entre las medias sea verdadera, y no debida al azar; se expresó del siguiente modo:

- ★ para $p < 0.05$ (95% de probabilidad)
- ★★ para $p < 0.01$ (99% de probabilidad)
- ★★★ para $p < 0.001$ (99.9% de probabilidad)

RESULTADOS

3.- RESULTADOS

3.1. ANALISIS Y ESTABLECIMIENTO IN VIVO DEL PERIODO CLAVE DE SUBNUTRICIÓN, DURANTE EL DESARROLLO, QUE PROVOCA UNA MAYOR PERTURBACIÓN DE LA SECRECIÓN DE INSULINA.

3.1.1. Estudio de los efectos producidos en distintos parámetros variando el periodo gestacional de subnutrición.

Los efectos de la subnutrición son consecuencia, sin duda, de las circunstancias que modulan de forma decisiva el proceso de adaptación a la falta de nutrientes. En periodos de desarrollo estas circunstancias serían fundamentalmente el tipo cualitativo que se establece y la etapa de inmadurez en que tiene lugar la restricción. Por ello, en nuestro trabajo sobre las posibles causas que perturban la secreción de insulina, comenzamos un estudio para un mismo modelo de subnutrición, sobre las alteraciones que se producen cuando se subnutre en distintas etapas de la gestación, para poder así centrar nuestro estudio sobre la etapa que apareciera como más decisiva perturbando la secreción de insulina.

3.1.1.1. Evolución del peso corporal en la madre durante la gestación.

En la Fig. 6, se presenta la evolución del peso corporal durante la gestación en las cuatro poblaciones de ratas consideradas: control, ratas subnutridas sólo durante el primer tercio de la gestación (0-7), ratas subnutridas sólo durante el segundo tercio de la gestación (7-14) y ratas subnutridas durante el último tercio de la gestación (14-21). Los resultados aparecen expresados como el incremento de peso que experimentan los animales a lo largo de la gestación en relación al peso que tenían en el momento de la concepción, siendo el peso medio de partida de los cuatro grupos muy similar (210-230g).

INCREMENTO DE PESO CORPORAL

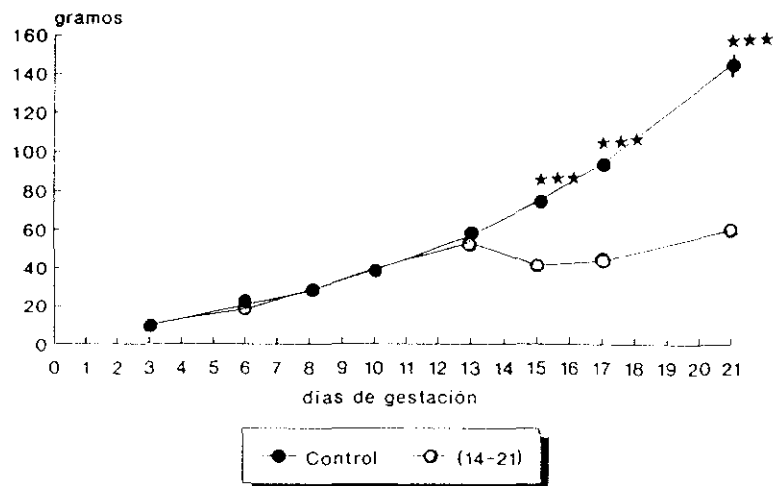
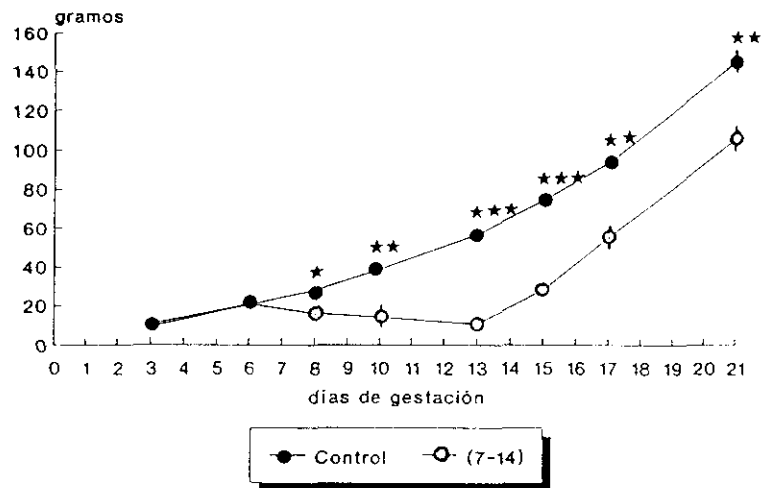
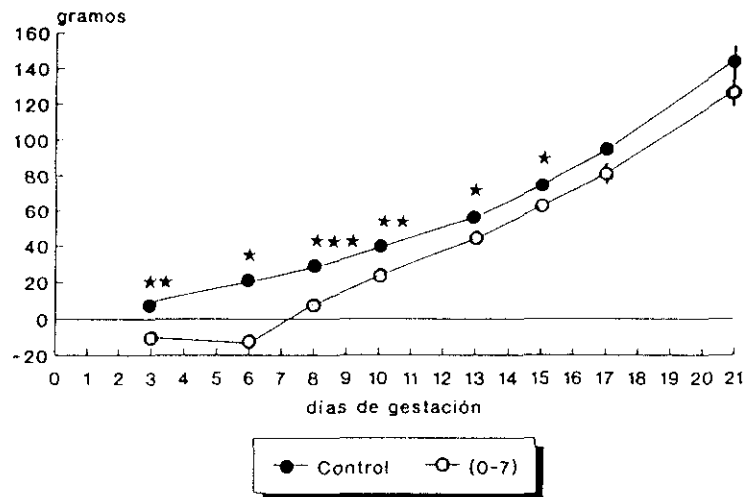


Fig. 6.- Incremento del peso corporal de ratas preñadas subnutridas durante el primer (0-7), segundo (7-14) y último (14-21) tercio de la gestación y el de sus respectivas controles. Media \pm E.S.

Como se observa en la figura, las madres controles incrementaron paulatinamente su peso durante la gestación. Las madres que fueron subnutridas durante la primera semana disminuyeron su peso corporal en este periodo para posteriormente aumentarlo cuando fueron realimentadas. A pesar de este incremento, el peso siguió siendo significativamente inferior al de las controles en la segunda semana y continuó disminuido hasta el final de la gestación, si bien en este momento las diferencias en cuanto al incremento de peso corporal ya no fueron estadísticamente significativas.

En el caso de las madres subnutridas entre los días 7 y 14 de gestación, se produjo una disminución significativa del peso corporal durante el periodo de restricción. A pesar de que la realimentación provocó un aumento en este parámetro, al final de la gestación el incremento en peso de las madres (7-14) ($106.1 \pm 21\text{g}$) fue significativamente inferior al de las controles y sólo representó el 70% del valor encontrado en esta población.

Finalmente, las madres que fueron subnutridas durante el último tercio de la gestación, no aumentaron prácticamente de peso durante este periodo, llegando a un incremento de peso al final de la gestación de tan sólo $60.2 \pm 4.9\text{g}$, que representa un 40% de lo encontrado en las madres control.

3.1.1.2. Glucemia, insulinemia y contenido pancreático de insulina en madres de 21 días de gestación.

Según se muestra en las Figs. 7a y 7b, la subnutrición de las madres en los distintos tercios de la gestación no provocó diferencias significativas en cuanto a la glucemia y la insulinemia a los 21 días con respecto a lo encontrado en las madres controles.

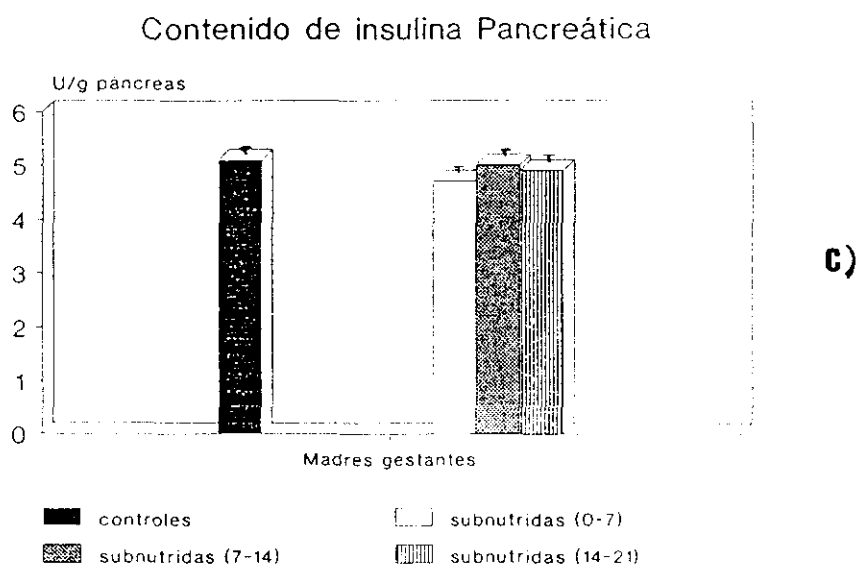
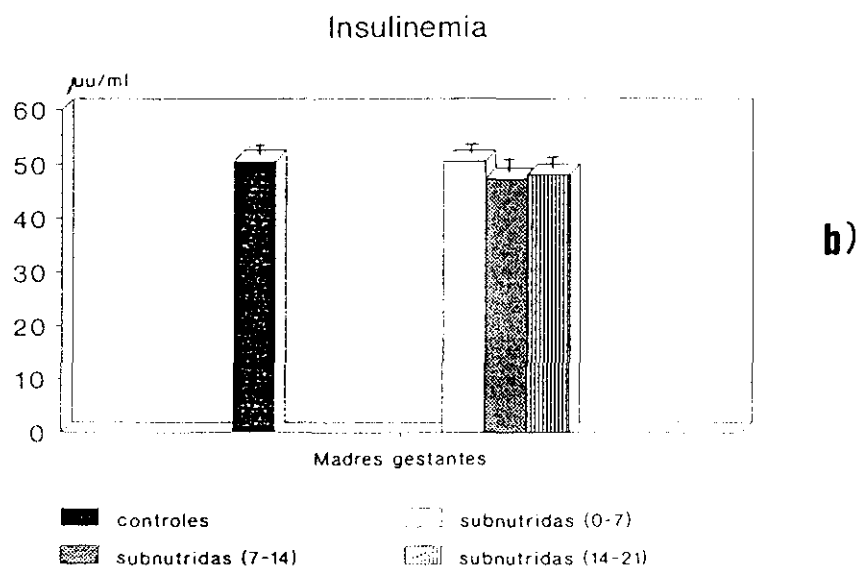
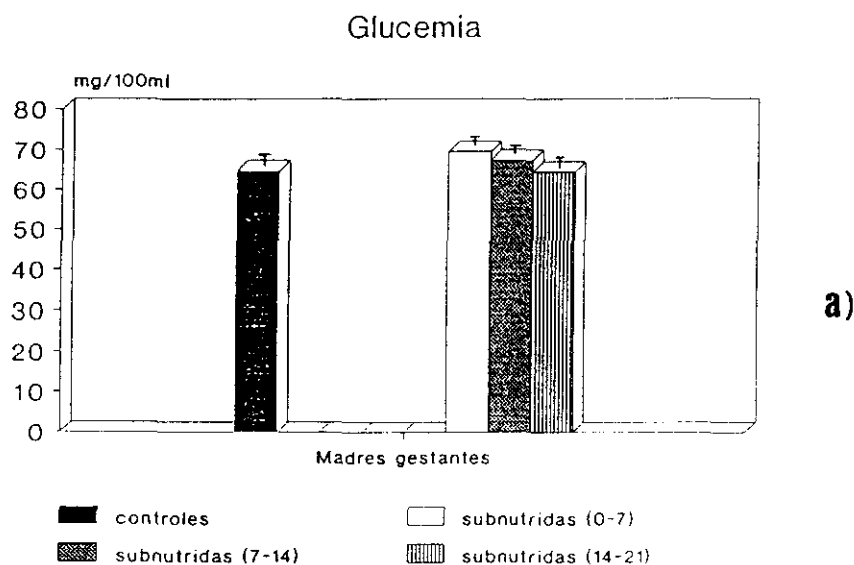


Fig. 7.- Glucemia(a), insulinemia(b) y contenido pancreático de insulina(c) en ratas preñadas de 21 días, controles y subnutridas durante el primer (0-7), segundo (7-14) y último (14-21) tercio de la gestación. Media \pm E.S.

Resultados similares se encuentran en cuanto al contenido de insulina pancreática [expresado en unidades de concentración (U/g páncreas)] en el mismo periodo (Fig. 7c).

3.1.1.3. Peso de cuerpo y páncreas de los fetos de 21 días de gestación.

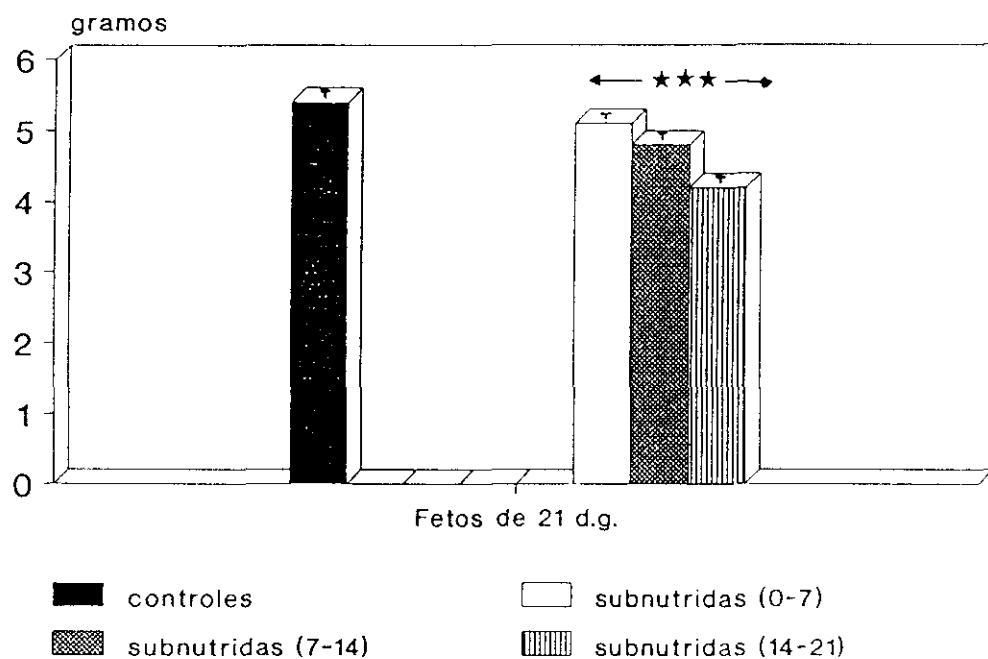
Cuando se evaluó el peso de cuerpo de los fetos de 21 días de gestación procedentes de las tres poblaciones de madres subnutridas (Fig. 8a), se observó que se encontraba significativamente disminuido en todos los casos con respecto a lo encontrado en los fetos de madre control. La diferencia más acusada, sin embargo, fue la de los fetos de 21 días procedentes de madres subnutridas en el último tercio de la gestación [$5.4 \pm 0.05\text{g}$ control, $4.4 \pm 0.03\text{g}$ fetos (14-21)], con una reducción de peso corporal del 20%.

A pesar de esta disminución de peso corporal en las tres poblaciones subnutridas, sólo los fetos procedentes de madres subnutridas en el último tercio de la gestación mostraron una disminución paralela del peso del páncreas (Fig. 8b). Cuando se calcula la relación peso del páncreas/peso del cuerpo en los fetos controles y los procedentes de madres subnutridas durante el último tercio de la gestación, se observa que esta relación está aumentada en los fetos de madres subnutridas [3.7 ± 0.02 control, 4.2 ± 0.03 subnutridas (14-21)].

3.1.1.4. Glucemia, insulinemia y contenido pancreático de insulina de los fetos de 21 días de gestación.

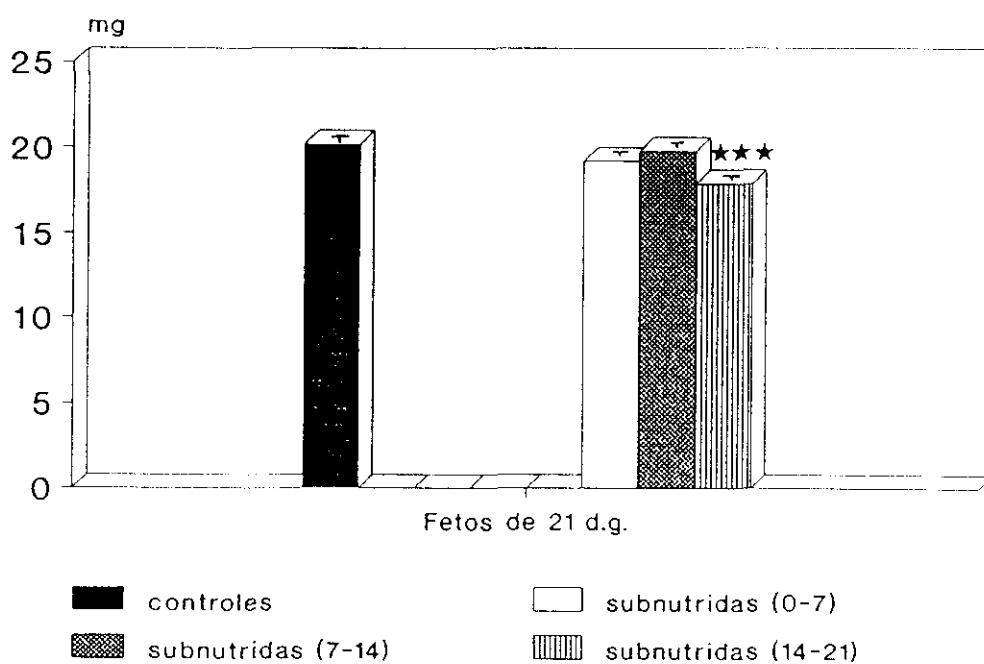
En la Fig. 9a, aparecen reflejados los valores de glucosa en sangre encontrados en las cuatro poblaciones de estudio. Como se puede observar, no hubo diferencias significativas en este parámetro entre los fetos de 21 días controles y los

Peso de Cuerpo



a)

Peso de Páncreas



b)

Fig. 8.- *Peso de cuerpo(a) y páncreas(b) de fetos de 21 días procedentes de madres controles y subnutridas durante el primer (0-7), segundo (7-14) y último (14-21) tercio de la gestación. Media \pm E.S.*

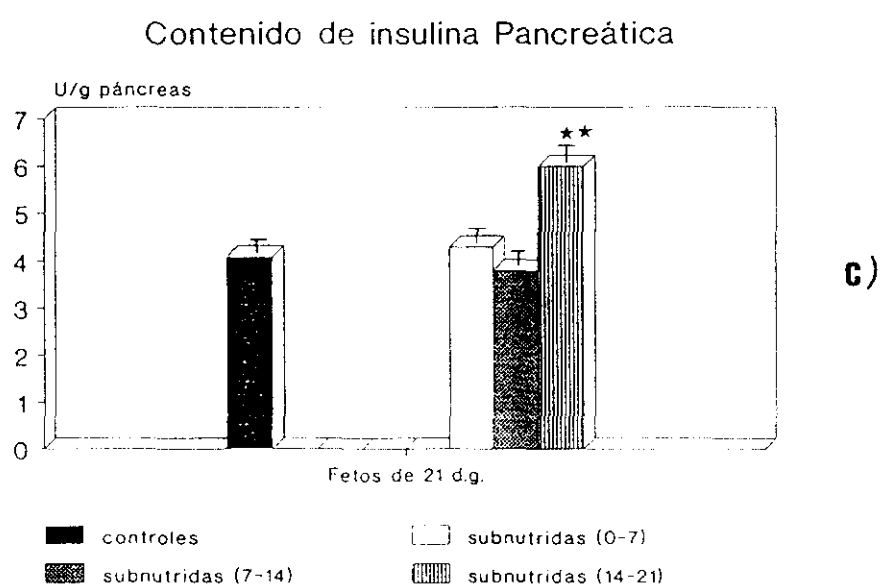
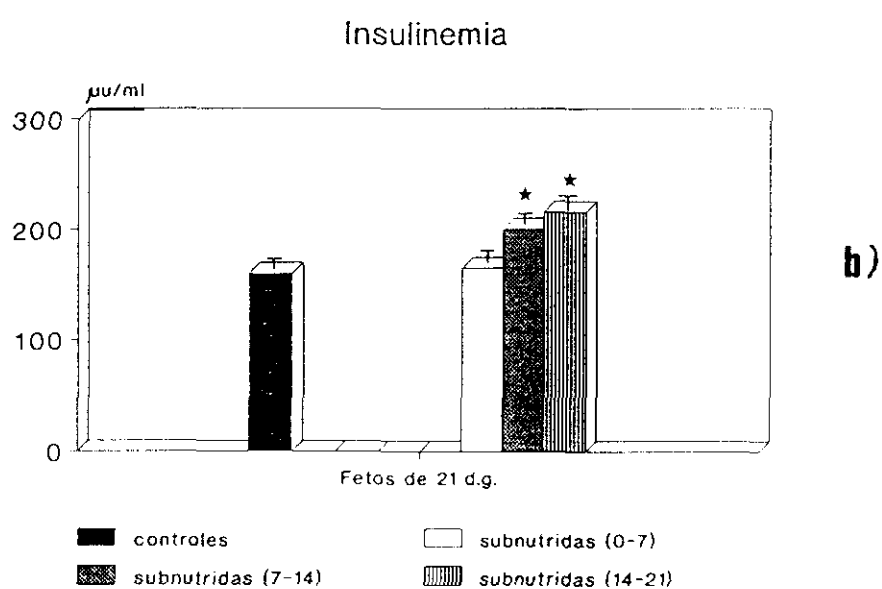
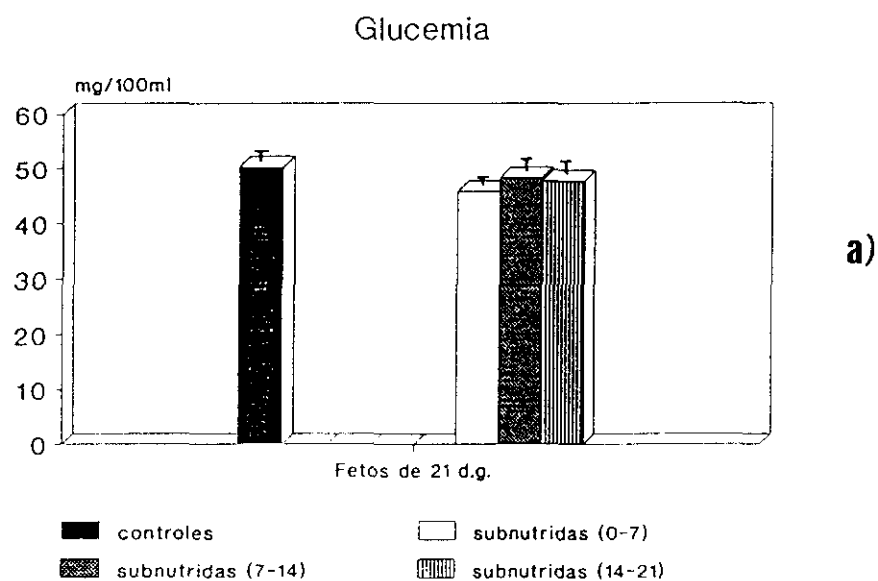


Fig. 9.- Glucemia(a), insulinemia(b) y contenido pancreático de insulina(c) en fetos de 21 días procedentes de madres controles y subnutridas durante el primer (0-7), segundo (7-14) y último (14-21) tercio de la gestación. Media \pm E.S.

fetos de las distintas etapas de subnutrición.

Cuando se evaluó la insulinemia (Fig. 9b) no se encontraron diferencias entre los fetos controles y los procedentes de madres subnutridas en la primera semana de gestación; pero este valor, sí que fue significativamente superior al de los fetos control en los fetos procedentes de madres subnutridas tanto en el segundo como en el último tercio de la gestación [$160.7 \pm 10.2 \mu\text{U/ml}$ control, $200.6 \pm 7.2 \mu\text{U/ml}$ (7-14) y $216.4 \pm 4.3 \mu\text{U/ml}$ (14-21)].

La concentración de insulina pancreática sólo se encontró significativamente aumentada, con respecto a la población control, en los fetos de madres subnutridas en la última semana de la gestación [4.1 ± 0.4 control, $6.0 \pm 0.5 \text{ U/g páncreas}$ (14-21)] (Fig. 9c).

3.1.1.5. Evolución del peso corporal durante la gestación de las ratas madres subnutridas desde el día 16 de gestación.

La Fig. 10 muestra el paralelismo de las dos poblaciones de animales, la control y la que iba a ser subnutrida, que experimentaron un incremento en su peso de cuerpo similar (74 ± 2.3 control, $71 \pm 3.1\text{g}$ subnutrida). Pero, a partir del día 16, las ratas que empezaron a ser subalimentadas no aumentaron prácticamente su peso de forma que, al final de la gestación, los incrementos en peso de cuerpo fueron significativamente diferentes (145 ± 3.1 control, $78 \pm 4.2\text{g}$ subnutrida).

3.1.1.6. Estudio de los parámetros anteriores comenzando la subnutrición el día 16 de gestación.

La tabla 1 muestra que las variaciones en glucemia, insulinemia y contenido de insulina pancreático en las madres gestantes de 21 días varían frente a las

INCREMENTO DE PESO CORPORAL

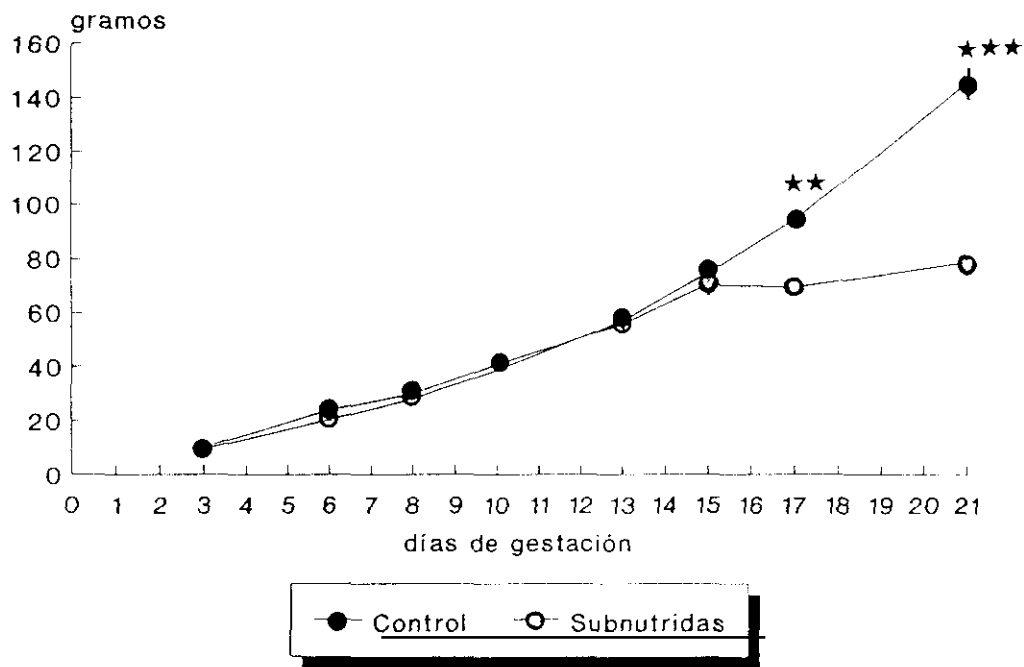


Fig. 10.- Incremento del peso corporal durante la gestación de madres controles y subnutridas desde el día 16 al 21 de gestación. Media \pm E.S.

Tabla 1.- Glucemia, insulinemia y contenido de insulina pancreático de madres de 21 días de gestación y peso de cuerpo y páncreas, glucemia, insulinemia y contenido de insulina pancreático de fetos de 21 días de gestación, todos ellos controles y subnutridos desde el día 16 al 21 de gestación. Los valores aparecen reflejados como media \pm E.S.

		CONTROLES	SUBNUTRIDOS
Madres de 21 d.d.g.	Glucemia (mg/100ml)	65.6 \pm 0.8	65.9 \pm 1.0
	Insulinemia (μ U/ml)	50.7 \pm 1.8	48.3 \pm 1.8
	Contenido pancreático (U/g páncreas)	5.03 \pm 0.05	4.91 \pm 0.08
Fetos de 21 d.d.g.	Peso cuerpo (g)	5.41 \pm 0.04	4.41 \pm 0.08 ^c
	Peso páncreas (mg)	20.22 \pm 0.04	17.92 \pm 0.87 ^b
	Glucemia (mg/100ml)	50.3 \pm 2.9	50.1 \pm 2.3
	Insulinemia (μ U/ml)	160.7 \pm 11.6	200.8 \pm 11.1 ^a
	Contenido pancreático (U/g páncreas)	4.11 \pm 0.22	6.90 \pm 0.33 ^c

^a p < 0.05 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

^b p < 0.01 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

^c p < 0.001 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

controles de igual forma, comenzando la subnutrición tanto a los 14 como a los 16 días de gestación, aclarando con ello una posible duda que existía en la literatura. No se encontraron diferencias ni en glucemia, insulinemia ni contenido pancreático de insulina con respecto a controles.

Los fetos de 21 días mostraron variaciones con respecto a controles, comenzando la subnutrición el día 16 de gestación, idénticas a las encontradas cuando la subnutrición se comienza el día 14 (Tabla 1).

3.1.1.7. Conclusiones del estudio de la subnutrición proteico-calórica variando la etapa gestante en que se provoca.

Del estudio de los parámetros anteriormente expuestos, realizados con la misma subnutrición proteico-calórica en los distintos tercios de la gestación, se deduce que los mayores efectos con respecto a la secreción de insulina parecen predominar en el último tercio. Los efectos son los mismos comenzando la subnutrición el día 14 ó el 16 de gestación y prolongándose hasta el día 21. En los estudios sucesivos que se van a exponer, la subnutrición se comenzó el día 14 de gestación.

3.1.2. Estudio de la secreción de insulina en ratas madres subnutridas en el último tercio de la gestación y en sus fetos.

3.1.2.1. Tolerancia a la glucosa en madres de 21 días de gestación.

En la Fig. 11A se muestra la evolución de la glucemia, en ratas gestantes subnutridas y controles, durante los 120 minutos posteriores a la administración de una sobrecarga de glucosa.

Las glucemias de partida fueron similares en las dos poblaciones (65.6 ± 0.8

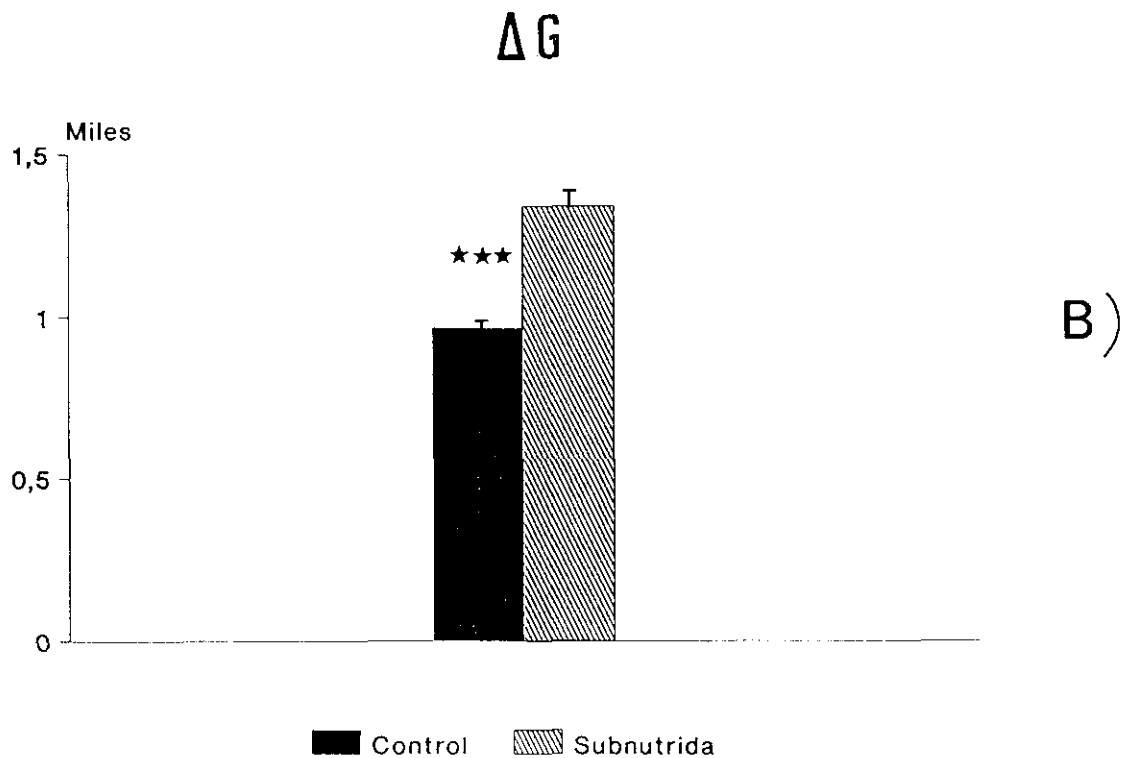
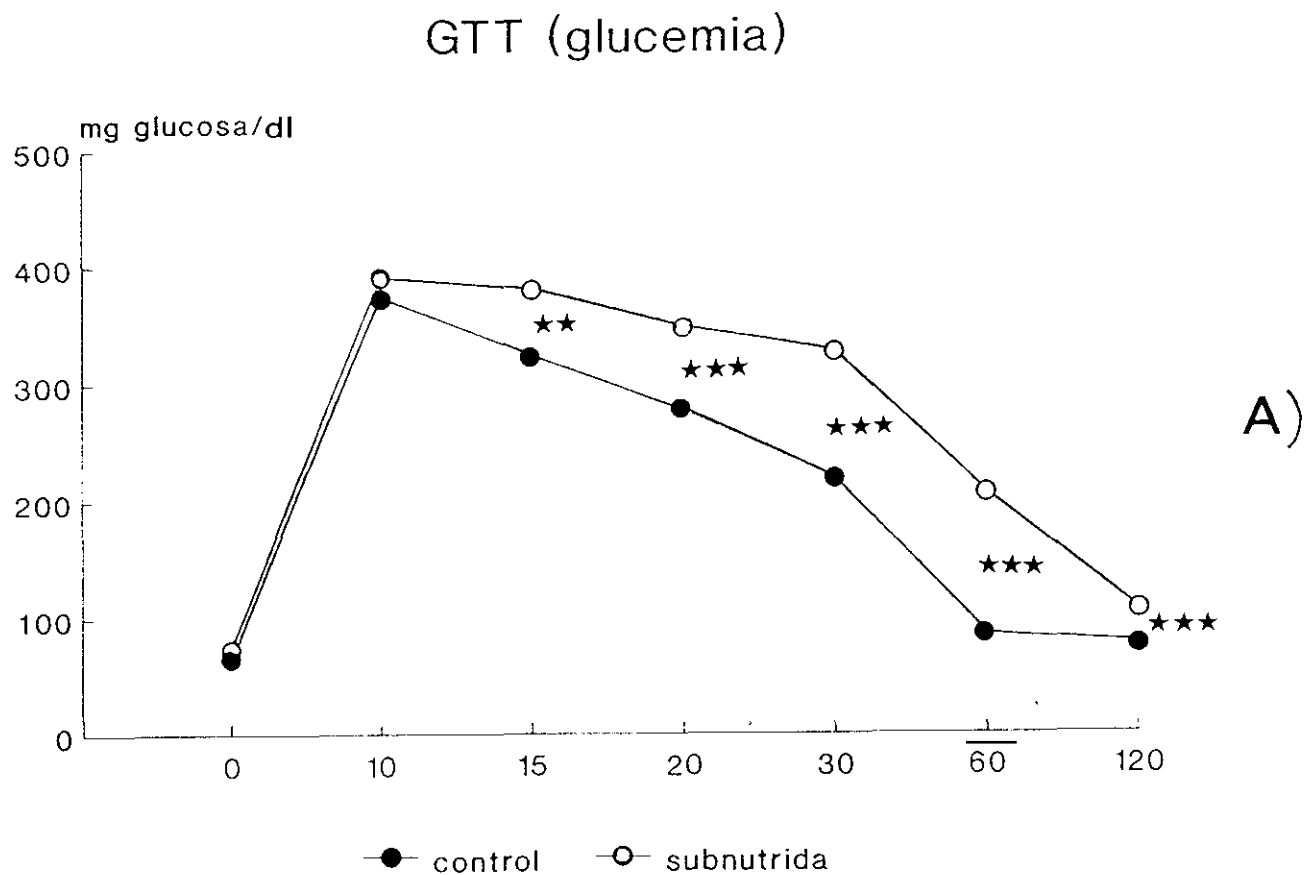
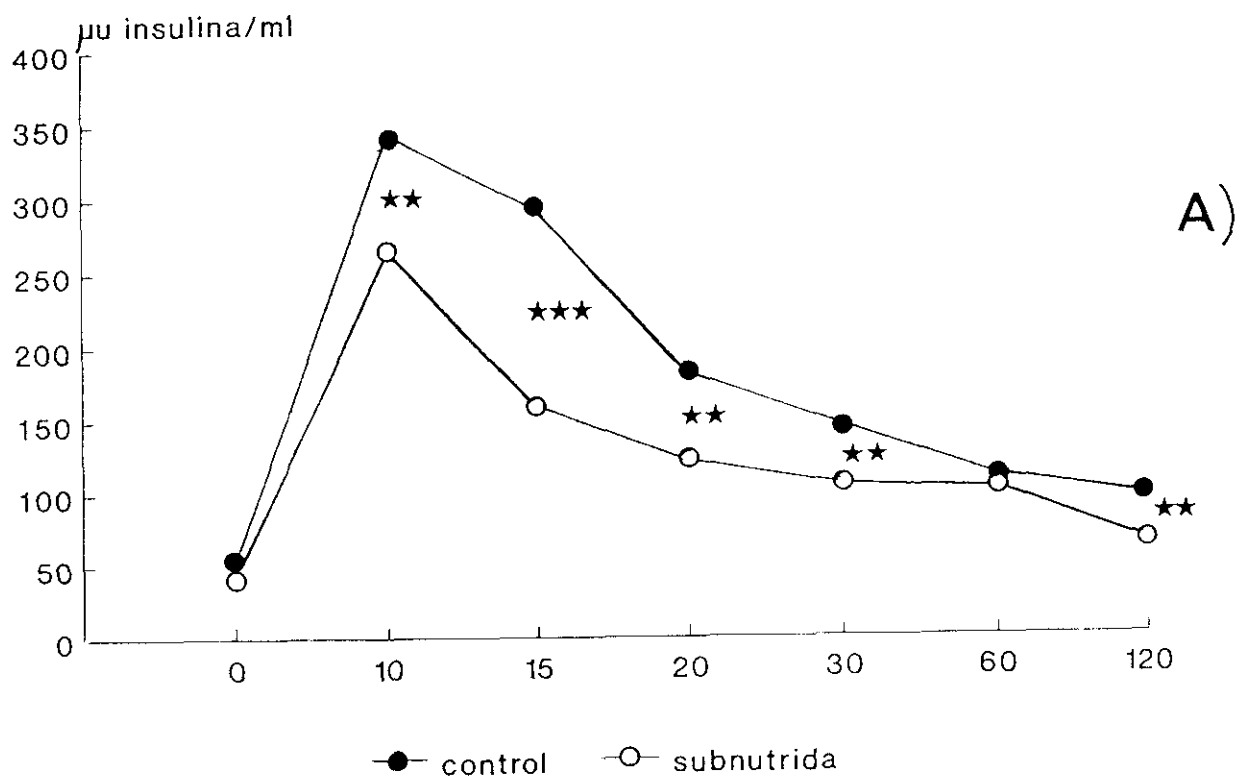


Fig. 11.- Prueba de tolerancia a la glucosa en ratas madres preñadas de 21 días, controles y subnutridas durante el último tercio de la gestación.
 A.- Evolución de la glucemia.
 B.- Respuestas integradas de la glucosa (AG).

GTT (insulinemia)



AI

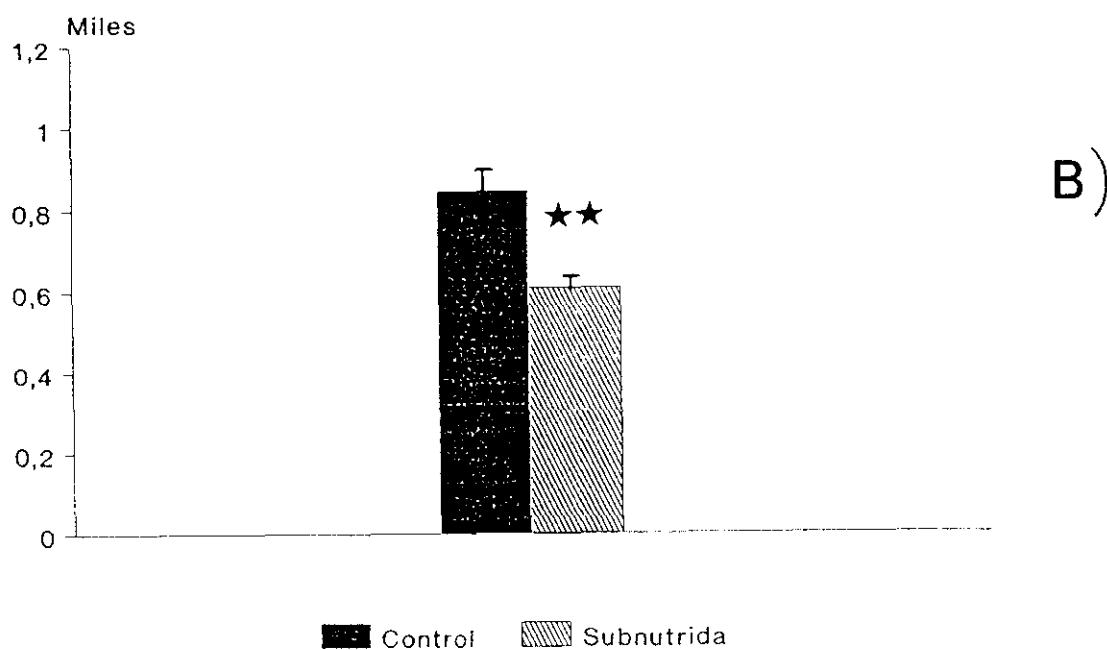


Fig. 12.- Prueba de tolerancia a la glucosa en ratas madres preñadas de 21 días, controles y subnutridas durante el último tercio de la gestación.
A.- Evolución de la insulina plasmática.
B.- Respuestas integradas de la insulina (AI).

control, $65.9 \pm 1.0\text{mg}/100\text{ml}$ subnutridas). La administración de la glucosa indujo una elevación de la glucemia que fue significativamente superior en las madres subnutridas durante todo el periodo de duración de la prueba. Así, la respuesta integrada de glucosa fue, de igual forma, significativamente superior en las madres subnutridas frente a las controles (964.4 ± 28.4 , 1336.1 ± 65.8 subnutridas) (Fig. 11B).

La variación de la insulina plasmática a lo largo de la prueba se muestra en la Fig. 12A.

Como se observa, la insulinemia de partida fue significativamente inferior en las madres gestantes subnutridas ($54.4 \pm 3.0\mu\text{U}/\text{ml}$ control, $40.7 \pm 0.5\mu\text{U}/\text{ml}$ subnutrida). La administración de glucosa provocó en ambos grupos de animales una elevación de la insulina en plasma a los 10 minutos que fue progresivamente disminuyendo a lo largo de la prueba, si bien este aumento fue significativamente inferior en los animales subnutridos; así, al calcular la respuesta integrada de insulina se encontró, de igual forma, significativamente disminuida en las madres gestantes subnutridas (843.7 ± 82.2 control, 607 ± 63.3 subnutrida) (Fig. 12B).

Cuando se calculó el índice insulinogénico (AI/AG) se encontró que estaba significativamente disminuido en las madres subnutridas frente a las controles (0.87 ± 0.03 control, 0.43 ± 0.01 subnutrida).

3.1.2.2. Secreción de insulina *in vitro* en madres de 21 días de gestación.

El estudio *in vitro* de la respuesta insulino-secretora se realizó con islotes de Langerhans aislados de páncreas de madres de 21 días de gestación tanto controles como subnutridas en el último tercio de la gestación.

Como aparece reflejado en la Fig. 13a, cuando se determinó el contenido de

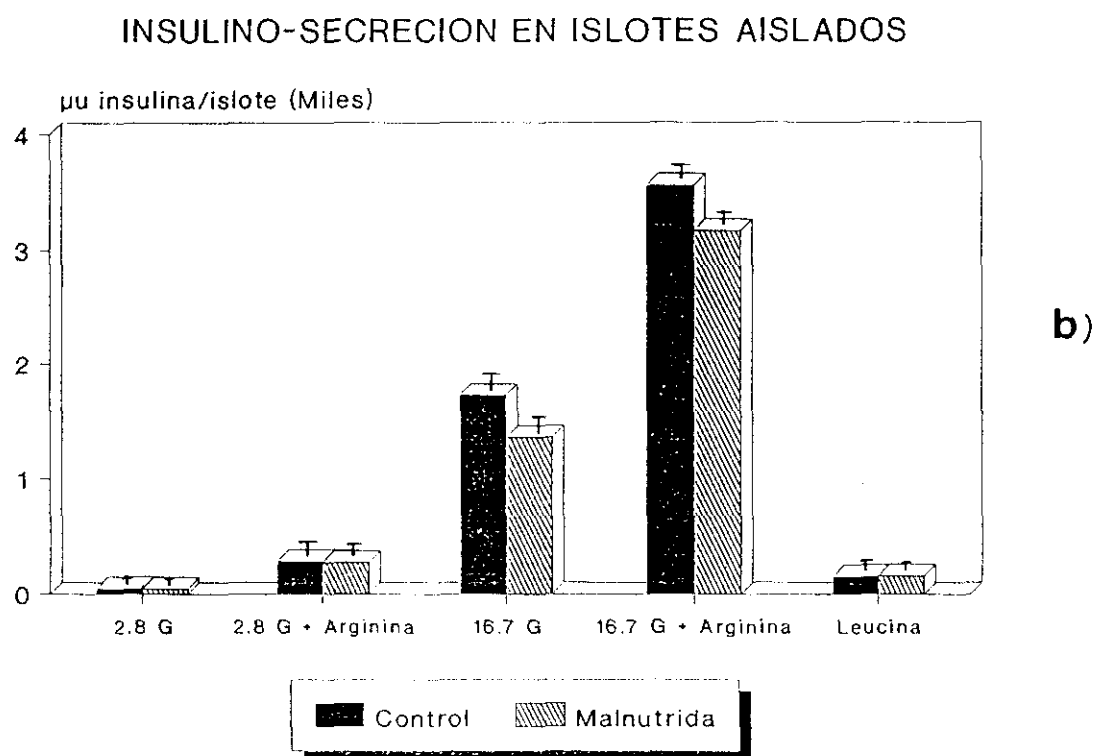
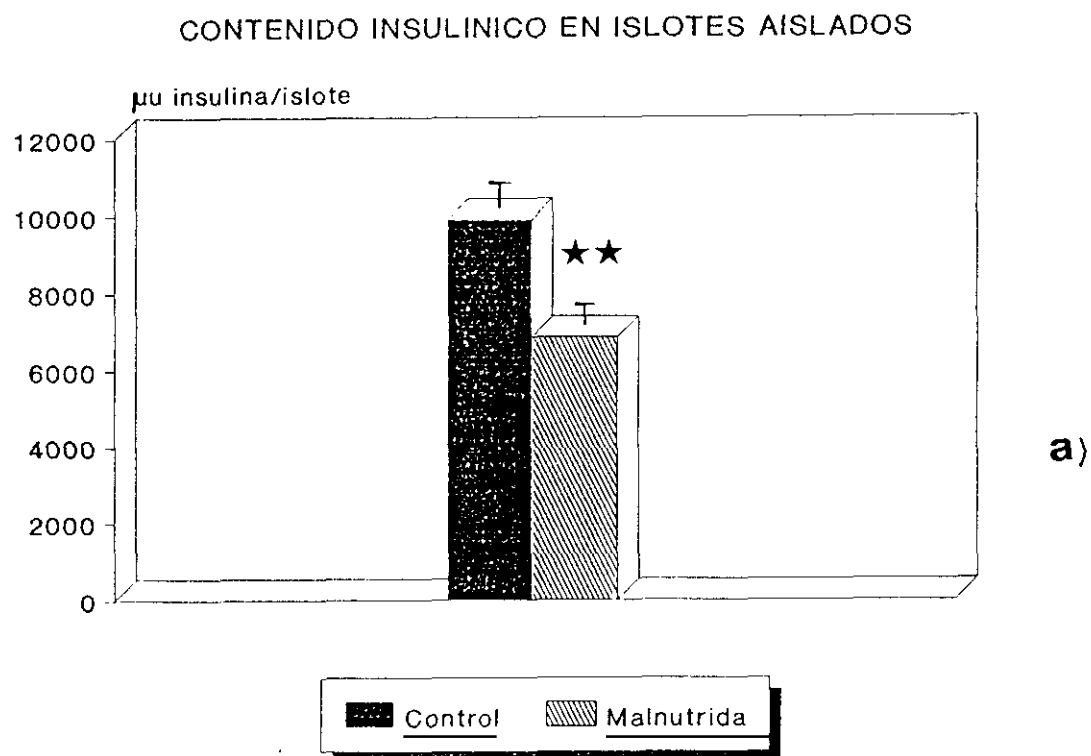


Fig. 13.- a) Contenido de insulina en islotes aislados de ratas preñadas de 21 días, controles y subnutridas durante el último tercio de la gestación. Media \pm E.S. b) Efecto de distintos secretagogos sobre la secreción de insulina de islotes aislados de ratas preñadas de 21 días, controles y subnutridas durante el último tercio de la gestación. Media \pm E.S.

Tabla 2.- Porcentaje de liberación de insulina en ratas madres preñadas de 21 días, controles y subnutridas durante el último tercio de la gestación. Media \pm E.S.

	Liberación de <u>Insulina</u> (%)	
	Madres controles	Madres subnutridas
2.8 G	0.54 \pm 0.03	0.68 \pm 0.07
2.8 G + Arginina	2.91 \pm 0.11	3.96 \pm 0.06 ^a
16.7 G	17.53 \pm 1.31	19.61 \pm 1.12
16.7 G + Arginina	36.91 \pm 1.31	45.14 \pm 1.62 ^a
Leucina	1.83 \pm 0.04	2.11 \pm 0.06

^a p < 0.05 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

insulina de los islotes aislados, se observó una disminución significativa en las ratas subnutridas ($6854 \pm 276\mu\text{U}$ insulina/islote) con respecto a lo encontrado en la población control ($9890 \pm 482\mu\text{U}$ insulina/islote).

Según se muestra en la Fig. 13b, los islotes de las dos poblaciones de madres incrementaron significativamente su respuesta a la glucosa cuando se aumentó la concentración de ésta en el medio de incubación (de 2.8mM a 16.7mM). Además, en ambos grupos, este incremento en la respuesta insulino-secretora fue superior cuando en el medio se añadió, también, el aminoácido arginina.

Cuando se comparan las dos poblaciones entre sí no se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones consideradas.

Como se refleja en la Tabla 2, al expresar la liberación de insulina en tanto por ciento aproximado (porcentaje de liberación de la hormona por los islotes en relación con el contenido insulínico de éstos), se observa que este porcentaje fue superior en los islotes de madres gestantes subnutridas en las dos condiciones en las que el medio se suplementó con arginina.

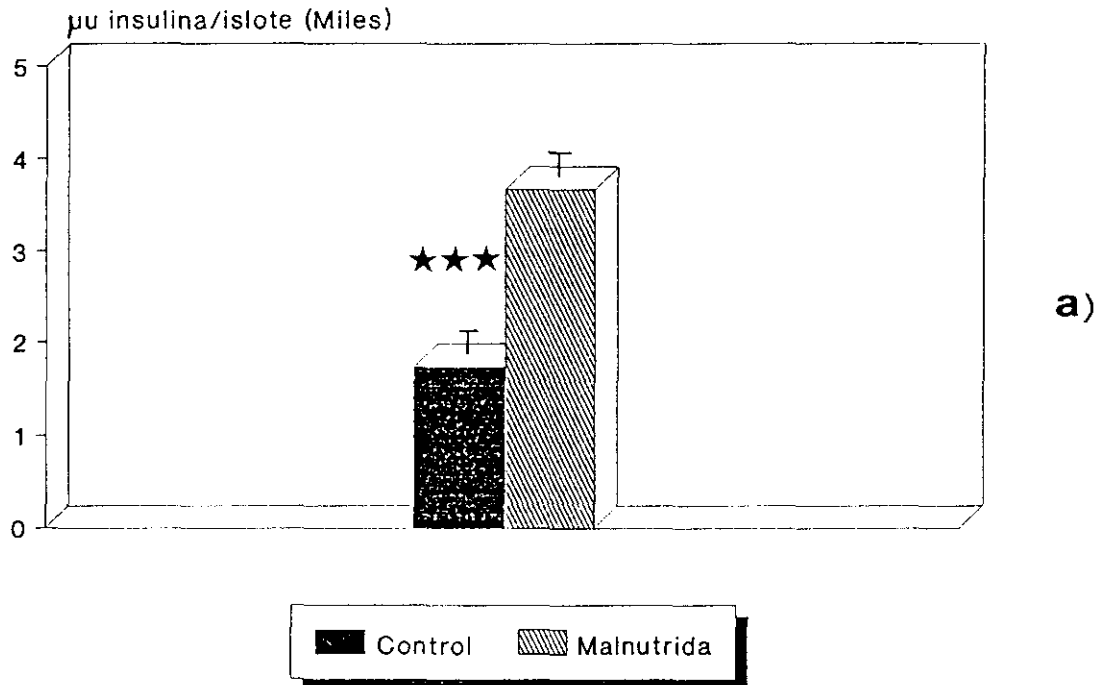
3.1.2.3. Secreción de insulina *in vitro* en fetos de 21 días de gestación.

La respuesta insulino-secretora de los islotes fetales se realizó después de mantenerlos en cultivo durante un periodo de 5 a 7 días.

En la Fig. 14a se observa que los islotes de fetos procedentes de madres subnutridas presentan un contenido insulínico significativamente superior al encontrado en los islotes de fetos controles ($1736 \pm 185\mu\text{U}$ insulina/islote control, $3668 \pm 124\mu\text{U}$ insulina/islote subnutrido); concretamente, el contenido se duplicó en los islotes de fetos procedentes de madres subnutridas.

El estudio de la respuesta insulino-secretora muestra que los islotes de los

CONTENIDO INSULINICO EN ISLOTES AISLADOS



INSULINO-SECRECION EN ISLOTES AISLADOS

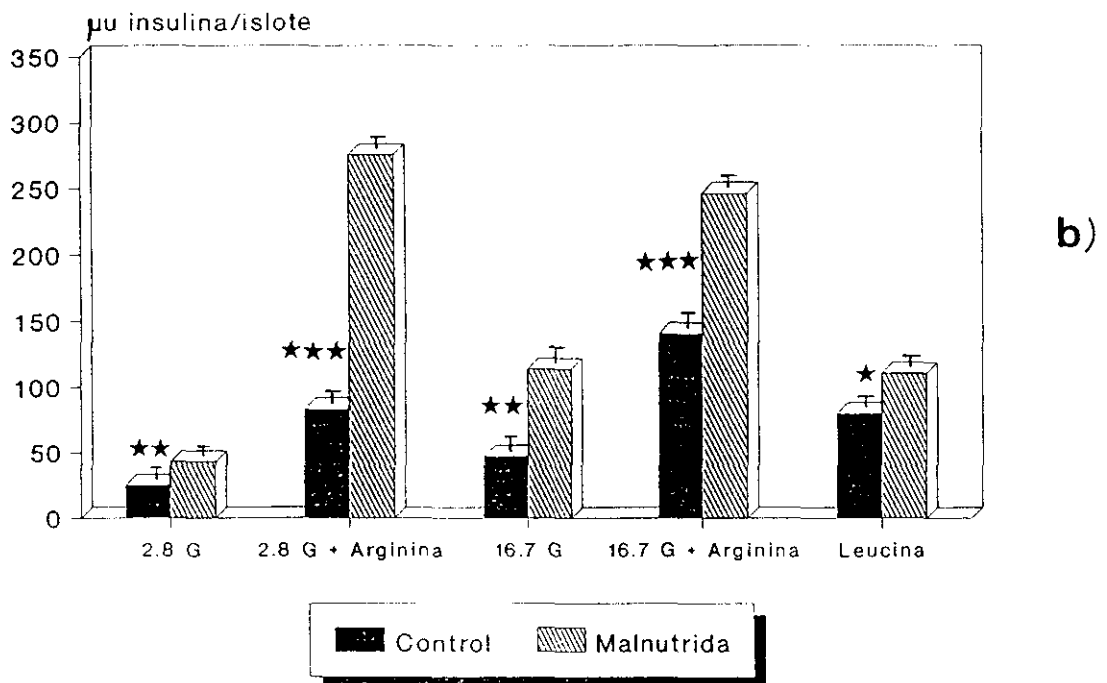


Fig. 14.- a) Contenido de insulina en islotes aislados de fetos de 21 días procedentes de madres controles y subnutridas durante el último tercio de la gestación. Media \pm E.S.

b) Efecto de distintos secretagogos sobre la secreción de insulina de islotes aislados de fetos de 21 días procedentes de madres controles y subnutridas durante el último tercio de la gestación. Media \pm E.S.

Tabla 3.- Porcentaje de liberación de insulina en islotes aislados de fetos de 21 días procedentes de madres controles y subnutridas durante el último tercio de la gestación, en respuesta a distintos secretagogos. Los resultados son expresados como media \pm E.S.

	Liberación de Insulina (%)	
	Fetos controles	Fetos subnutridos
2.8 G	1.24 \pm 0.04	1.18 \pm 0.09
2.8 G + Arginina	4.62 \pm 0.11	7.62 \pm 0.21 ^b
16.7 G	2.85 \pm 0.07	3.13 \pm 0.12
16.7 G + Arginina	8.01 \pm 0.73	7.12 \pm 0.81
Leucina	4.62 \pm 0.18	3.42 \pm 0.10 ^a

^a p < 0.05 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

^b p < 0.01 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

fetos controles prácticamente responden igual a la glucosa en situación basal (2.8mM) que en situación estimulante (16.7mM). Sin embargo, esta respuesta se ve significativamente incrementada cuando se añade al medio de incubación arginina 19mM ($25.1 \pm 2.3\mu\text{U}$ insulina/islote con 2.8mM de glucosa, $83.7 \pm 31.3\mu\text{U}$ insulina/islote con 2.8mM de glucosa más arginina y $47.8 \pm 9.1\mu\text{U}$ insulina/islote con 16.7mM de glucosa, $140.8 \pm 10.4\mu\text{U}$ insulina/islote con 16.7mM de glucosa más arginina). Además, la respuesta insulino-secretora a la leucina ($80.6 \pm 6.8\mu\text{U}$ insulina/islote) es también significativamente superior a la encontrada en respuesta a la glucosa en cualquiera de las condiciones consideradas (basal y estimulante) (Fig. 14b).

Cuando se observa la respuesta de los islotes de fetos procedentes de madres subnutridas nos encontramos una mayor respuesta insulino-secretora al aumento en el medio de incubación de la concentración de glucosa ($43.3 \pm 4.7\mu\text{U}$ insulina/islote con 2.8mM de glucosa, $113.8 \pm 9.9\mu\text{U}$ insulina/islote con 16.7mM de glucosa); respuesta que aumenta significativamente cuando se añade al medio arginina 19mM.

Si se comparan las dos poblaciones entre sí, la respuesta secretora de insulina es significativamente superior en los islotes de fetos procedentes de madres subnutridas en cualquiera de las situaciones evaluadas.

El porcentaje de liberación aproximado de insulina (Tabla 3) se encontró también significativamente aumentado en los islotes de fetos procedentes de madres subnutridas en los casos en los que se estimuló con 2.8mM de glucosa más 19mM de arginina y con leucina.

3.1.2.4. Estudio histológico del páncreas de fetos de 21 días de gestación.

El examen al microscopio óptico de los páncreas de 21 días de gestación,

controles y subnutridos, mostró una buena morfología endocrina y exocrina.

Como se puede observar en la Fig. 15, los islotes se componen de un núcleo denso de células B marcadas (color sepia), rodeado por una franja de células endocrinas no marcadas que se diluyen entre el tejido exocrino. Ocasionalmente, se pueden observar células marcadas en los conductos pancreáticos.

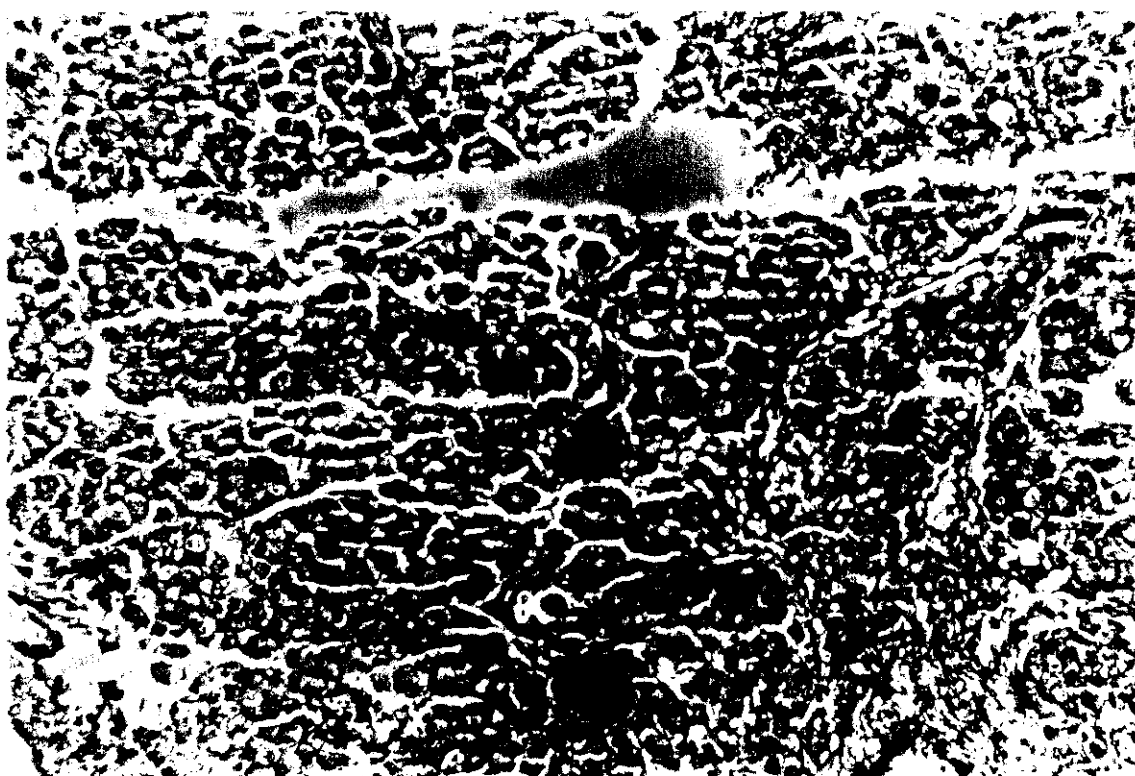
Los islotes de los fetos procedentes de madres subnutridas (Fig. 15B) se ven mayores y más numerosos que los de los fetos controles (Fig. 15A).

3.1.2.5. Porcentaje y masa de células B de fetos de 21 días de gestación.

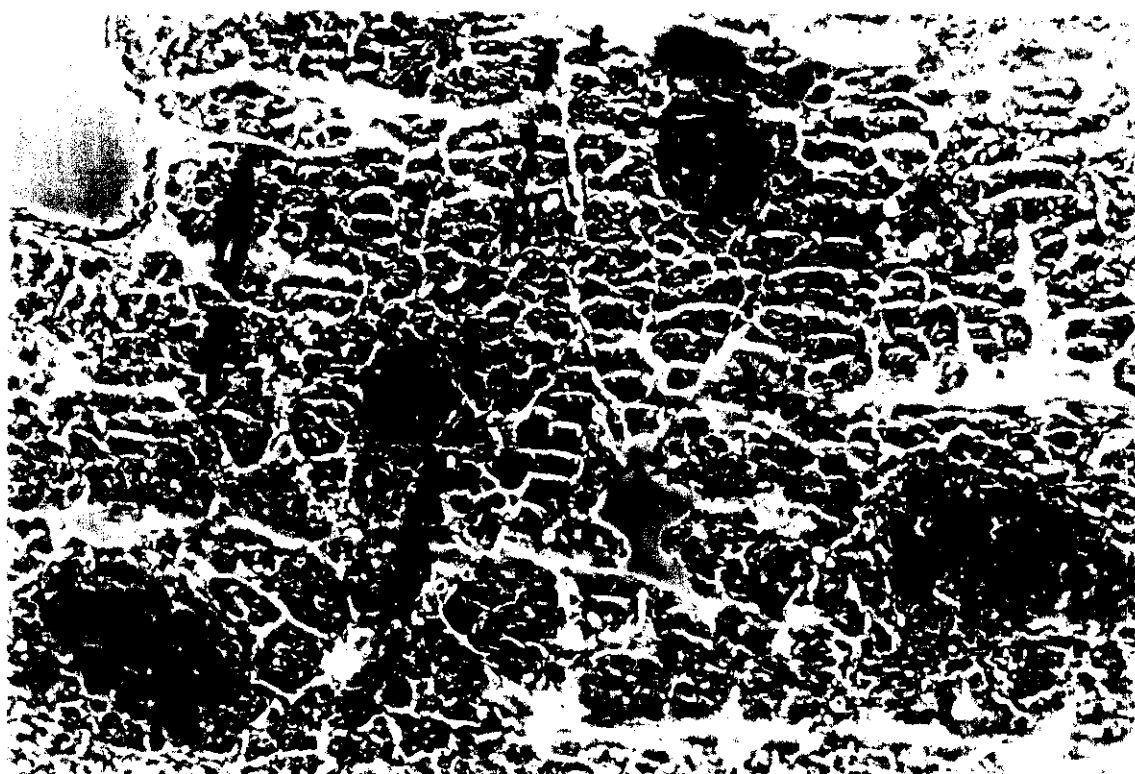
Cuando se calculó el porcentaje de células B existentes en los páncreas de fetos controles y subnutridos (Tabla 4), se observó un aumento significativo de este parámetro en los fetos subnutridos con respecto a los fetos control; concretamente, este porcentaje aumentó en un 50%. En el mismo orden, se encontró aumentada la masa de células B total por páncreas en los fetos subnutridos frente a los controles.

3.1.2.6. Conclusiones de los estudios realizados en madre y descendencia, subnutridos en el último tercio de la gestación.

Los tests de tolerancia a la glucosa efectuados en madre subnutrida en el último tercio de la gestación, muestran una intolerancia a la glucosa aún más acentuada que la manifestada en madre gestante alimentada con respecto a una virgen. Sin duda esta mayor intolerancia a la glucosa de la madre subnutrida esté encaminado fisiológicamente a facilitar la disponibilidad de nutrientes al feto en momentos de carencia alimenticia en la madre. Esta protección tiene como consecuencia la llegada masiva de nutrientes al feto, en mayor cantidad que en madre gestante nutrida; todo ello explica, creemos, el aumento del número de islotes de



A)



B)

Fig. 15.- Fotografías realizadas al microscopio óptico de células beta de fetos de 21 días procedentes de madres controles (A) y subnutridas durante el último tercio de la gestación (B). X 20

Tabla 4.- Porcentaje y masa de células beta pancreáticas de fetos de 21 días procedentes de madres controles y subnutridas durante el último tercio de la gestación. Se presentan los resultados como media \pm E.S.

	Porcentaje de células beta (%)	Masa de células beta (mg)
Fetos controles	0.80 ± 0.02	0.19 ± 0.02
Fetos subnutridos	1.32 ± 0.09^a	0.29 ± 0.03^a

^a $p < 0.001$ relativo a las ratas control del mismo día de vida.

Langerhans y de la insulina plasmática que encontramos en fetos de 21 días de gestación de madre subnutrida, así como la hipersecreción de insulina de los islotes de estos fetos aislados y estimulados con glucosa.

3.2. ESTUDIO EN FETO, NEONATOS DE 4, 14 Y 23 DIAS DE VIDA Y EN ADULTO DE LAS REPERCUSIONES EN LA SECRECIÓN DE INSULINA DE LA SUBNUTRICIÓN COMENZADA EN EL ÚLTIMO TERCIO DE LA GESTACIÓN Y CONTINUADA HASTA LA EDAD ADULTA.

3.2.1. Consecuencias en distintos parámetros de la subnutrición comenzada en la última parte de la gestación.

3.2.1.1. Evolución del peso corporal.

Como se puede observar en la Fig. 16, el modelo experimental de subnutrición empleado provoca una significativa disminución del peso corporal en todas las etapas consideradas.

Los fetos a término (21 días de gestación) que provenían de madres subnutridas presentaron una disminución de peso del 15%, aproximadamente, con respecto a aquellos fetos de madres alimentadas *ad libitum* ($5.4 \pm 0.05\text{g}$ grupo subnutrido y $4.4 \pm 0.03\text{g}$ grupo control). Además, durante la lactancia, las ratas subnutridas aumentaron de peso en una tasa inferior a la de las controles y, en consecuencia, en el momento del destete (23 días de vida), el peso de éstas ($22.1 \pm 0.77\text{g}$) sólo fue el 45% del de sus correspondientes controles ($47.5 \pm 1.3\text{g}$).

Finalmente, la diferencia de peso se mantuvo en la etapa adulta, por lo que los animales subnutridos de 70 días de vida pesaron un 55% menos que sus controles ($106.7 \pm 1.86\text{g}$ subnutridos y $233.9 \pm 3.13\text{g}$ controles).

3.2.1.2. Evolución del peso del páncreas.

En concordancia con el menor tamaño encontrado en las ratas subnutridas, el peso de los páncreas de estos animales fue significativamente inferior al de sus respectivos controles.

PESO DEL CUERPO

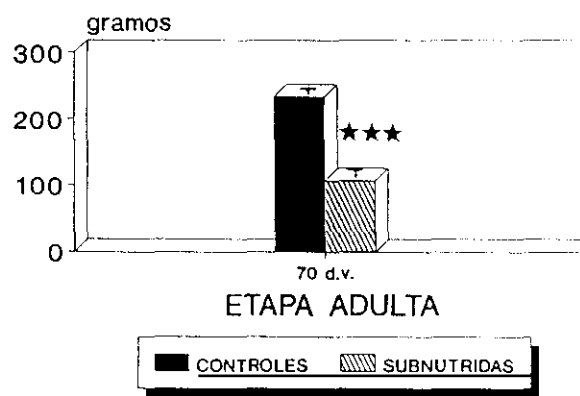
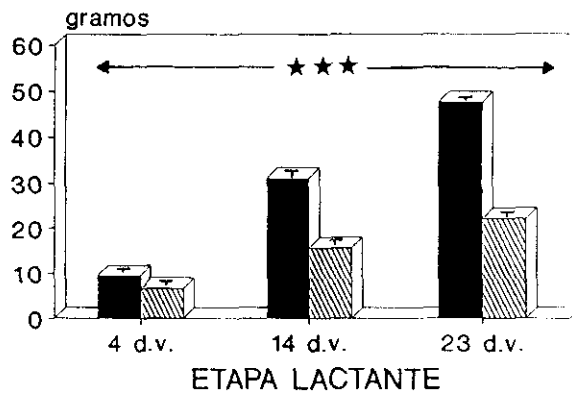
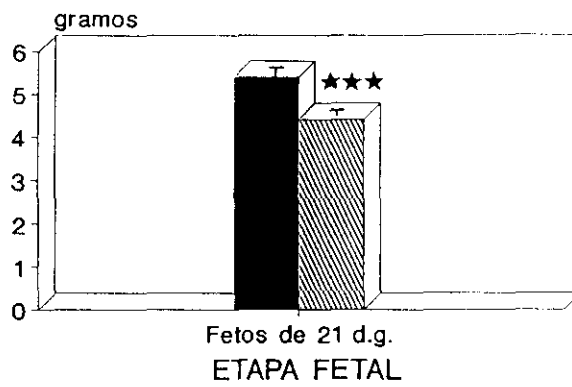


Fig. 16.- Peso corporal de ratas subnutridas y controles en las etapas fetal, lactante y adulta. Media \pm E.S.

Como se muestra en la Fig. 17, en los fetos subnutridos de 21 días de gestación ya se observó una disminución del peso de este órgano de aproximadamente un 10%.

Al igual que ocurriera con el peso del cuerpo, la diferencia entre ambos grupos se agudizó durante la lactancia. De esta forma, en el momento del destete, el peso de los páncreas de las ratas subnutridas se encontró disminuido aproximadamente en un 45 % ($113.9 \pm 5.24\text{mg}$ grupo subnutrido y $210.7 \pm 9.08\text{mg}$ grupo control). A partir del destete, se mantuvo esta diferencia y el peso del páncreas de las ratas subnutridas de 70 días de vida ($459.6 \pm 39.09\text{mg}$) sólo fue el 55% del de las ratas control ($846.0 \pm 24.28\text{mg}$).

3.2.1.3 Relación peso del páncreas/peso del cuerpo en los distintos estadios estudiados.

Debido a la disminución del peso corporal que experimentan las ratas subnutridas, hemos de tener en cuenta que el peso que se obtiene de sus páncreas se compara con el de animales que presentan un tamaño corporal superior. Por tanto, para poder establecer comparaciones más exactas entre ambos grupos de animales, es conveniente evaluar la relación que existe entre el peso del páncreas y el peso del cuerpo.

Según se refleja en la Tabla 5, al comparar la relación peso páncreas/peso cuerpo a lo largo de los estadios estudiados, se observó que aparecía disminuida a los 14 días de vida y aumentada a los 23 en las dos poblaciones de animales. Por otro lado, comparando entre sí ambos grupos, se encontró que, en todas las etapas consideradas, la relación fue significativamente mayor en las ratas subnutridas.

PESO DEL PANCREAS

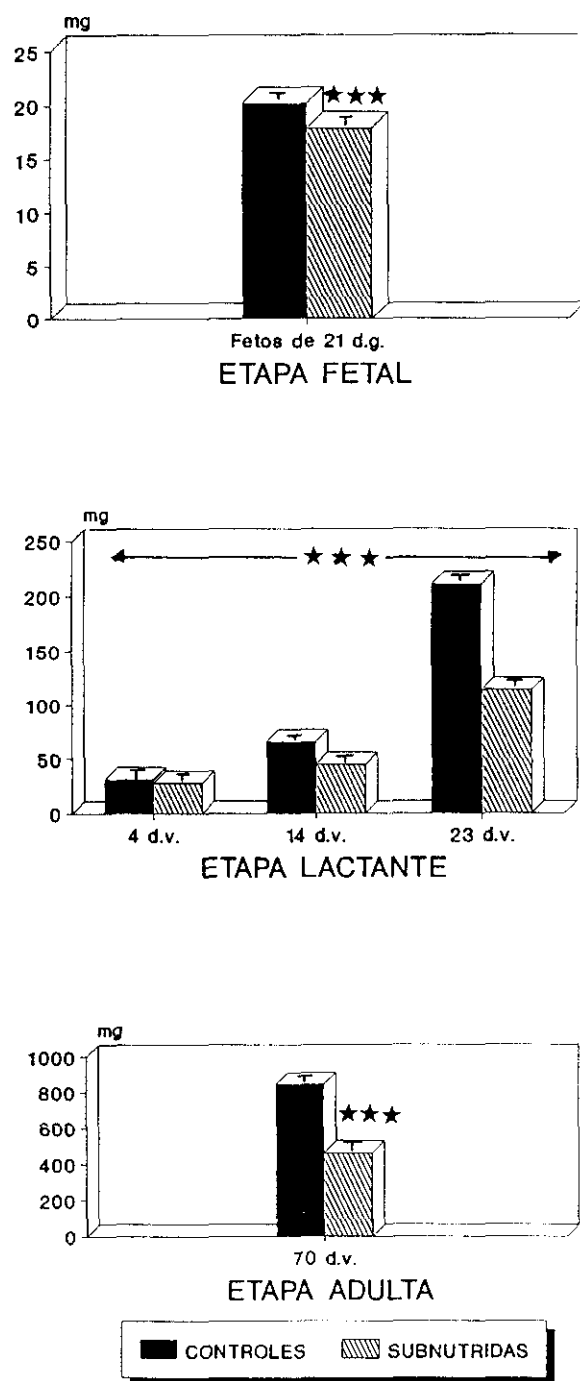


Fig. 17.- Peso del páncreas de ratas subnutridas y controles en las etapas fetal, lactante y adulta. Media \pm E.S.

Tabla 5.- Relación pesopáncreas/peso cuerpo en fetos de 21 días de gestación y a los 4, 14, 23 y 70 días de vida, controles y subnutridos. Media \pm E.S.

EDAD	Peso páncreas/Peso cuerpo (mg/g)	
	CONTROLES	SUBNUTRIDAS
Fetos 21 d.g.	3.74 \pm 0.02	4.07 \pm 0.02 ^a
4 d.v.	3.25 \pm 0.01	4.03 \pm 0.04 ^a
14 d.v.	2.14 \pm 0.03	2.85 \pm 0.02 ^a
23 d.v.	4.38 \pm 0.09	5.23 \pm 0.1 ^a
70 d.v.	3.88 \pm 0.04	4.92 \pm 0.05 ^a

^a p < 0.05 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

3.2.1.4. Evolución de la glucemia e insulinemia en las etapas estudiadas.

Los fetos controles y los subnutridos mostraron una glucemia de 50.56 ± 0.7 mg/100ml controles y 50.27 ± 0.33 mg/100ml subnutridos, lo cual supone que presentan una hipoglucemia con respecto a los niveles obtenidos a partir del nacimiento. La subnutrición no afecta a las tasas de glucemia normales en feto. Lo mismo sucede con los animales subnutridos a los 4, 14, 23 y 70 días de vida que mostraban unos niveles de glucemia iguales a los de sus controles (Fig. 18a).

En la Fig. 18b aparecen reflejadas las concentraciones plasmáticas de insulina de las dos poblaciones de animales estudiadas. Como se puede observar, los fetos de ambos grupos de 21 días de gestación fueron fisiológicamente hiperinsulinémicos comparados con los valores obtenidos a partir del nacimiento; sin embargo, dicha hiperinsulinemia fue significativamente mayor en los animales subnutridos (150.3 ± 11.2 μ u/ml controles y 202.6 ± 14.89 μ u/ml subnutridas).

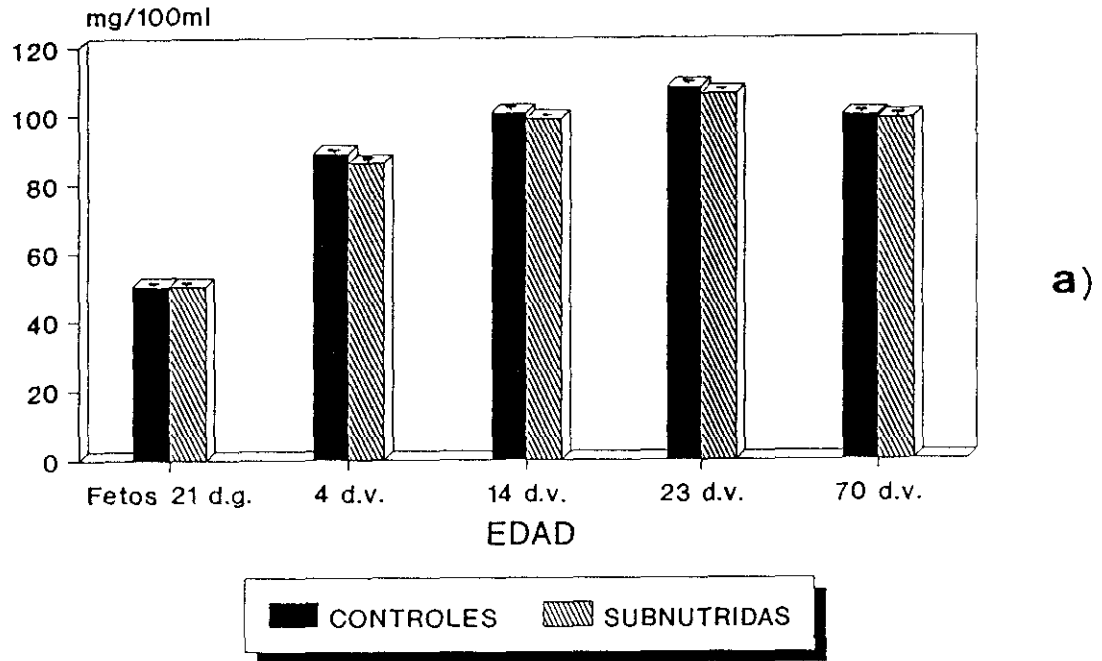
Por el contrario, a las edades de 4, 14, 23 y 70 días de vida, el resultado se invirtió y las ratas con alimentación restringida se mostraron hipoinsulinémicas con respecto a sus controles. Esta disminución de la concentración de insulina plasmática fue significativa en todas las etapas mencionadas.

3.2.1.5. Evolución del contenido pancreático de insulina.

Según se expuso en el apartado 3.2.1.2., hemos de considerar que el peso de los páncreas de las ratas subnutridas fue muy inferior al de sus respectivos controles de igual edad. Por tanto, para poder comparar los dos grupos de animales se expresaron los resultados en unidades de concentración (unidades de insulina/gramo de páncreas).

De esta forma, cuando se consideró la concentración de insulina pancreática

GLUCEMIA



INSULINEMIA

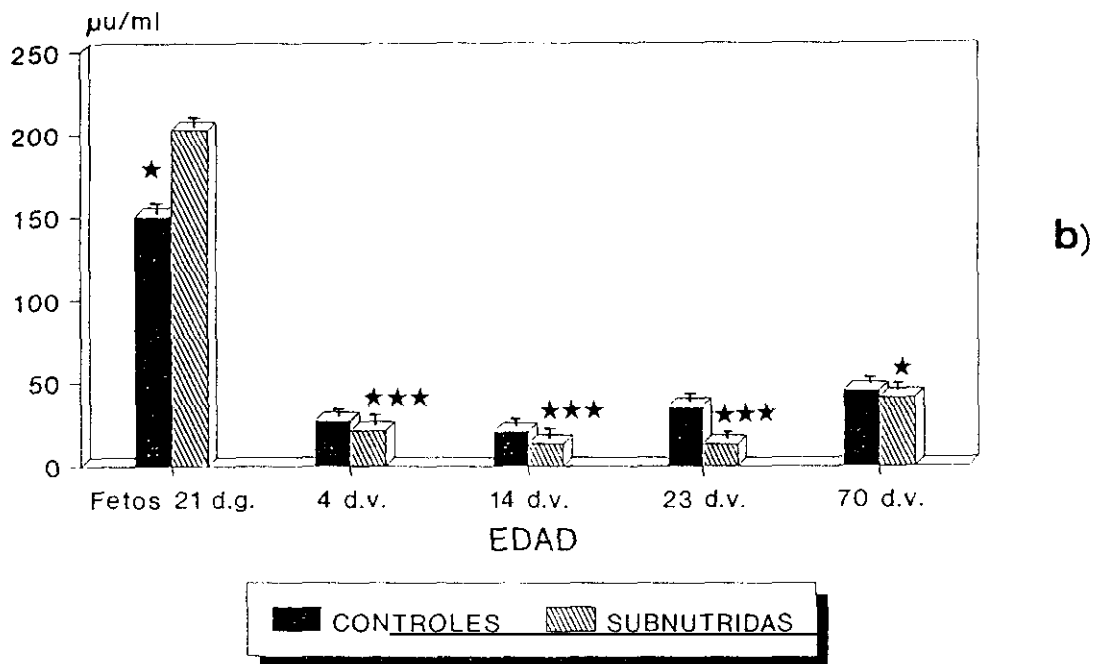


Fig. 18.- a) Glucemia de fetos de 21 d.d.g. y ratas de 4, 14, 23 y 70 días de vida, controles y subnutridos. Media \pm E.S.
 b) Insulinemia en fetos de 21 d.d.g. y ratas de 4, 14, 23 y 70 días de vida, controles y subnutridos. Media \pm E.S.

CONTENIDO DE INSULINA PANCREATICA

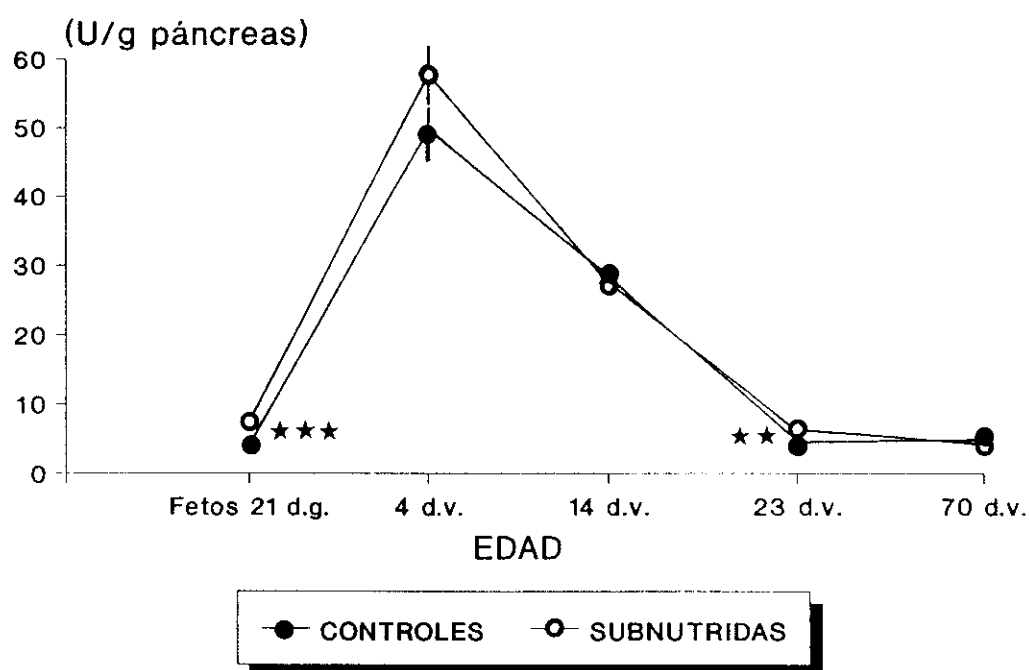


Fig. 19.- Concentración de insulina pancreática en fetos de 21 d.d.g. y ratas de 4, 14, 23 y 70 días de vida, controles y subnutridas. Los resultados aparecen expresados como Media \pm E.S.

(Fig. 19), se encontró un incremento significativo en los fetos de 21 días de gestación y en las ratas de 23 días de vida del grupo subnutrido, con respecto a sus correspondientes controles. Sin embargo, en el resto de los estadios considerados: 4, 14 y 70 días de vida, no hubo diferencias en la concentración de la hormona entre ambos grupos.

Por otro lado, cabe destacar cómo, a los 4 días de vida, aparece un pico en la concentración de insulina pancreática en las dos poblaciones. Se puede observar que este parámetro en dicho día es, aproximadamente, quince veces superior a lo encontrado en fetos de 21 días de gestación en el grupo control y ocho veces superior en el subnutrido.

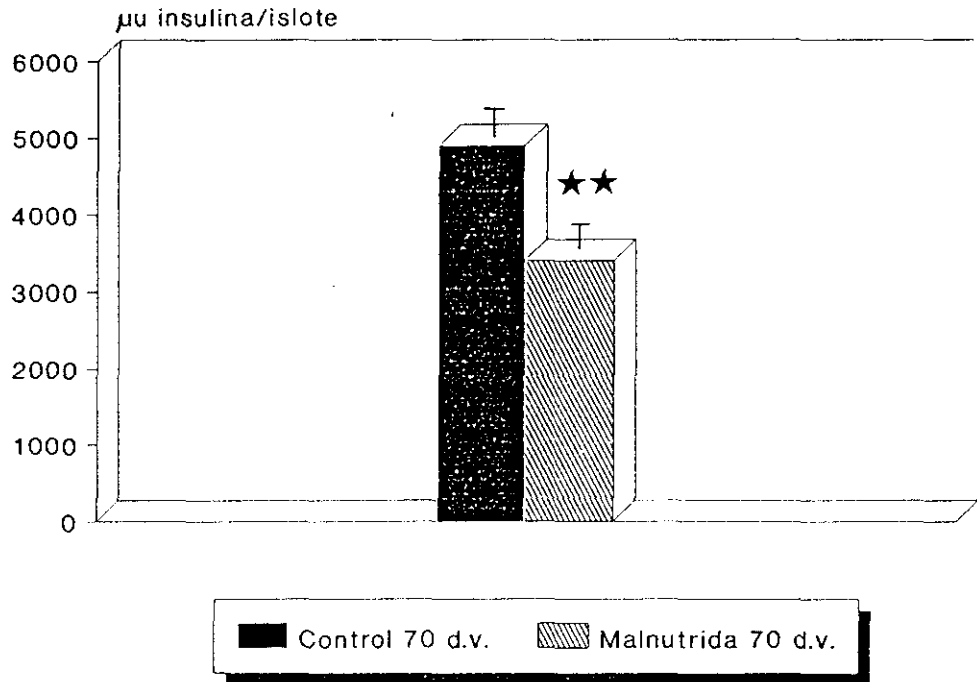
3.2.1.6. Secreción de insulina *in vitro* en ratas de 70 días de vida.

Como aparece reflejado en la Fig. 20a, cuando se determina el contenido insulínico de los islotes aislados de las dos poblaciones de ratas, control y subnutrida, se observa que está significativamente disminuido en las ratas subnutridas ($3398 \pm 274.5\mu\text{U}$ insulina/islote) frente a lo encontrado en el grupo control ($4894 \pm 161.8\mu\text{U}$ insulina/islote).

Ambos grupos de islotes incrementaron su secreción de insulina en respuesta tanto a un aumento en la concentración de glucosa (de 2.8mM a 16.7mM) como a la adición de arginina 19mM al medio de incubación (Fig. 20b). Sin embargo, la respuesta sólo fue similar entre las dos poblaciones en la situación basal de glucosa (2.8mM), mientras que en el resto de las condiciones consideradas fue significativamente inferior en los islotes de ratas subnutridas con respecto a lo encontrado en el grupo control.

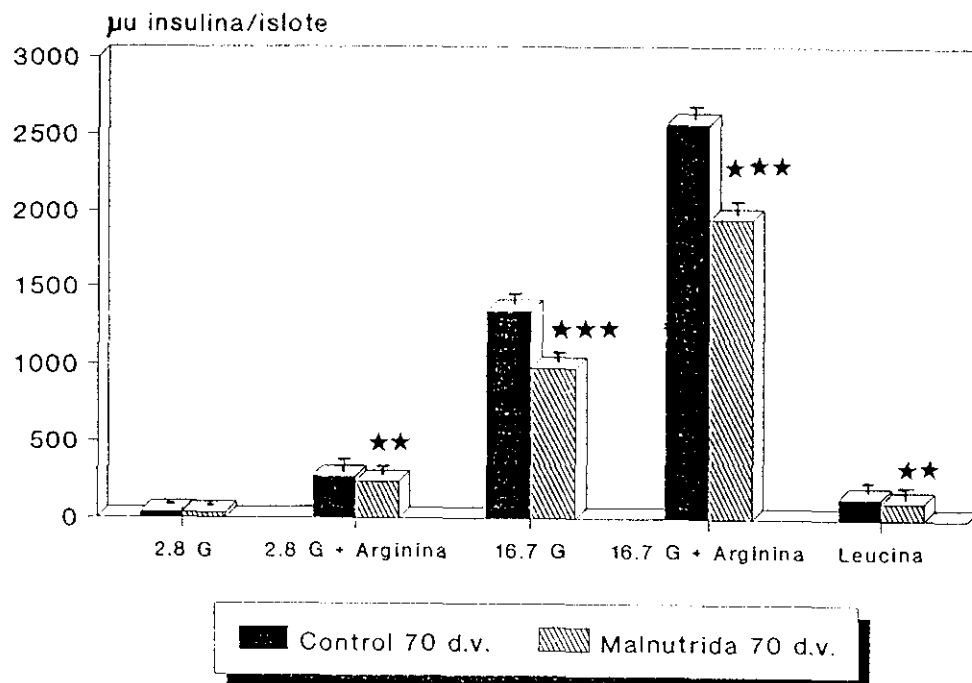
En la Tabla 6 se puede observar que el porcentaje aproximado de liberación

CONTENIDO INSULINICO EN ISLOTES AISLADOS



a)

INSULINO-SECRECION EN ISLOTES AISLADOS



b)

Fig. 20.- a) Contenido de insulina en islotes aislados de ratas controles y subnutridas de 70 días de vida. Media \pm E.S.

b) Efecto de distintos secretagogos sobre la secreción de insulina de islotes aislados de ratas subnutridas y controles de 70 días de vida. Media \pm E.S.

Tabla 6.- Porcentaje de liberación de insulina, en islotes aislados de ratas subnutridas y controles de 70 días de vida, en respuesta a distintos secretagogos. Media \pm E.S.

	Liberación de Insulina (%)	
	CONTROLES 70 d.v.	SUBNUTRIDAS 70 d.v.
2.8 G	0.89 \pm 0.02	1.0 \pm 0.03 ^a
2.8 G + Arginina	5.6 \pm 0.5	6.9 \pm 0.3 ^a
16.7 G	27.4 \pm 1.3	29.0 \pm 1.4
16.7 G + Arginina	51.9 \pm 2.9	57.8 \pm 2.0 ^a
Leucina	2.9 \pm 0.06	3.2 \pm 0.07 ^a

^a p < 0.05 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

de insulina fue significativamente superior en los islotes de ratas subnutridas en todas las condiciones consideradas menos en la situación estimulante de glucosa (16.7mM).

3.2.1.7. Estudio histológico del páncreas de ratas de 4 y 70 días de vida.

Las glándulas pancreáticas de las ratas de 4 y 70 días de vida, controles y subnutridas, presentaron una morfología normal.

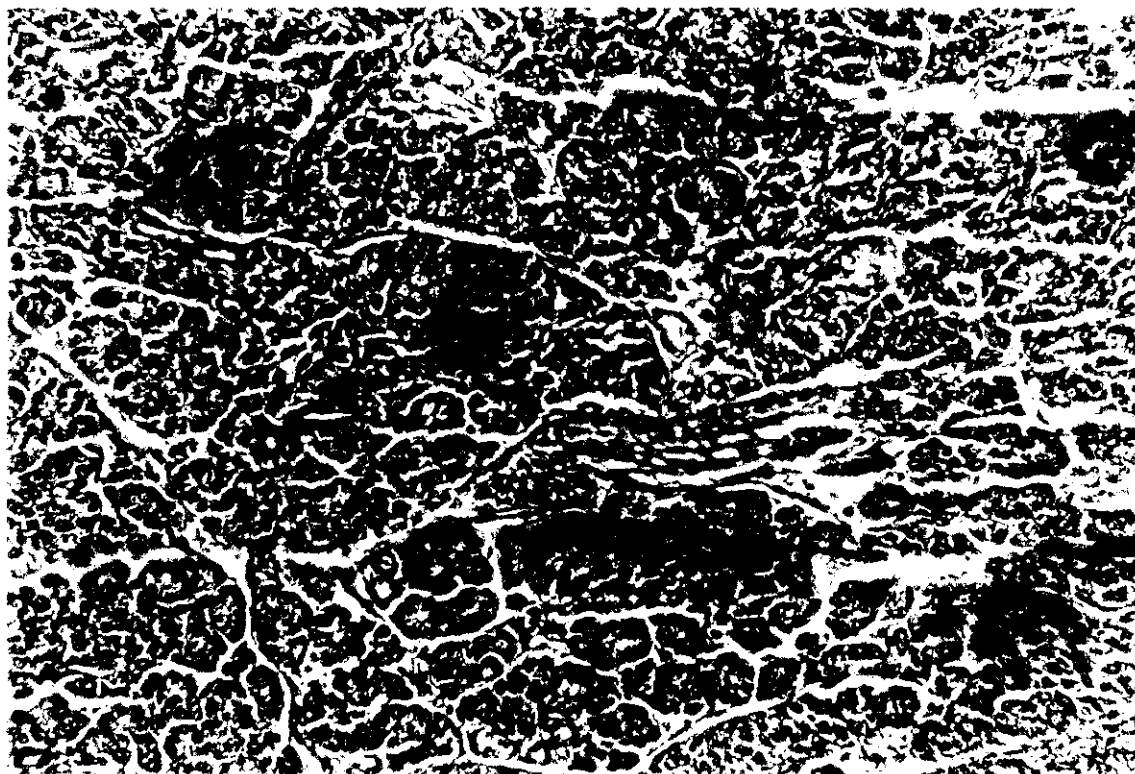
Los islotes aparecen claramente contorneados dentro del parénquima. La parte central de los islotes está intensamente marcada por la insulina y se encuentra rodeada de células endocrinas no insulino secretoras.

El número y el tamaño de los islotes a los 4 días de vida aumenta con respecto a lo encontrado en los fetos de 21 días de gestación (sección 2.4.) en ambas poblaciones, control y subnutrida; sin embargo, al comparar los dos grupos entre sí se observa un aumento en el número y tamaño de los islotes en los páncreas de ratas de 4 días de vida control (Fig. 21A) frente a los subnutridos (Fig. 21B).

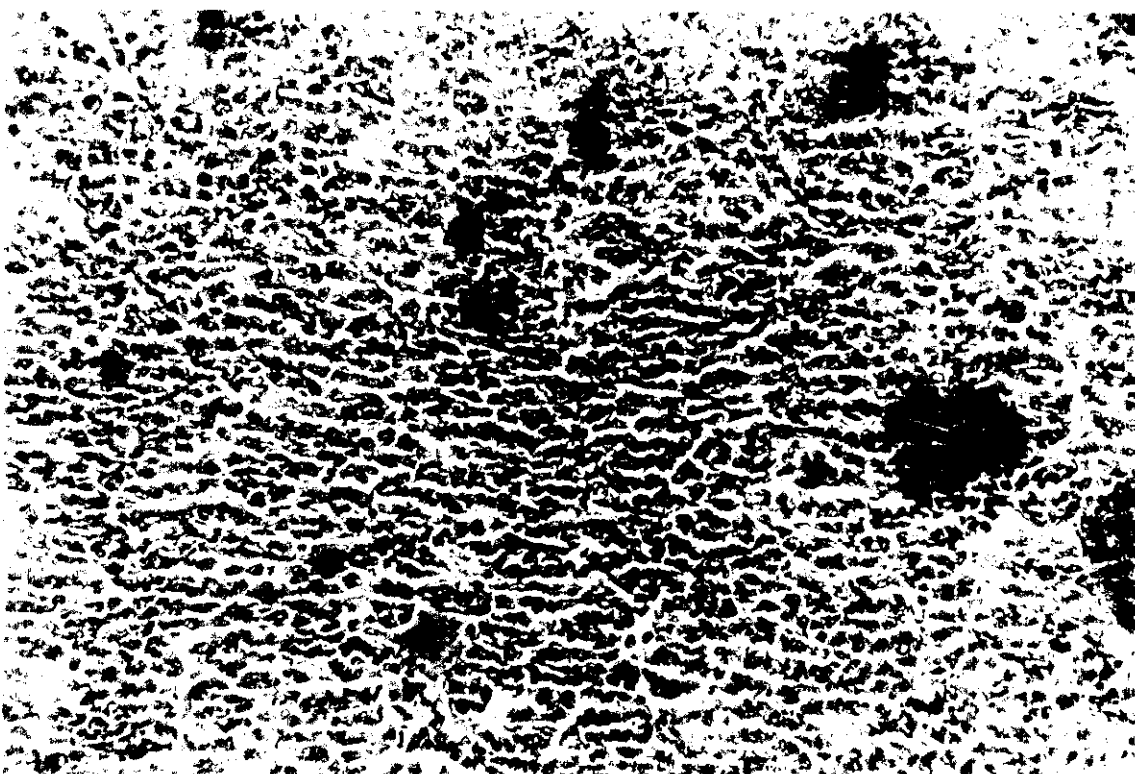
A los 70 días de vida, el número de islotes disminuye en las dos poblaciones y no se pueden distinguir diferencias entre los páncreas de ratas controles y de ratas subnutridas (Fig. 22A y 22B, respectivamente).

3.2.1.8. Porcentaje y masa de células B de ratas de 4 y 70 días de vida.

El porcentaje de células B a los 4 días de vida aumenta con respecto a lo encontrado en los fetos de 21 días de gestación en un 200% en el caso del grupo control y sólo un 20% en el caso del grupo subnutrido; esto hace, que a los 4 días de vida el porcentaje de células B está significativamente disminuido en las ratas subnutridas. En el mismo sentido, la masa total de células B por páncreas se encontró disminuida significativamente en las ratas subnutridas de 4 días de vida

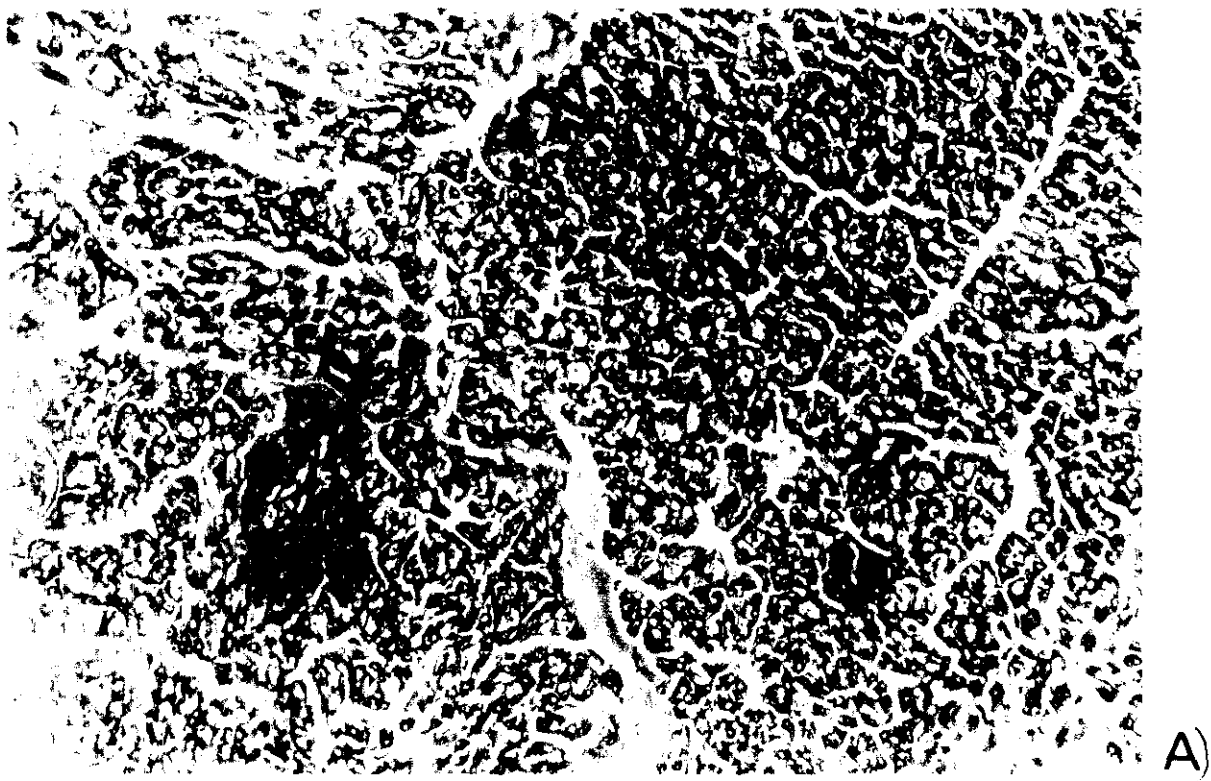


A)

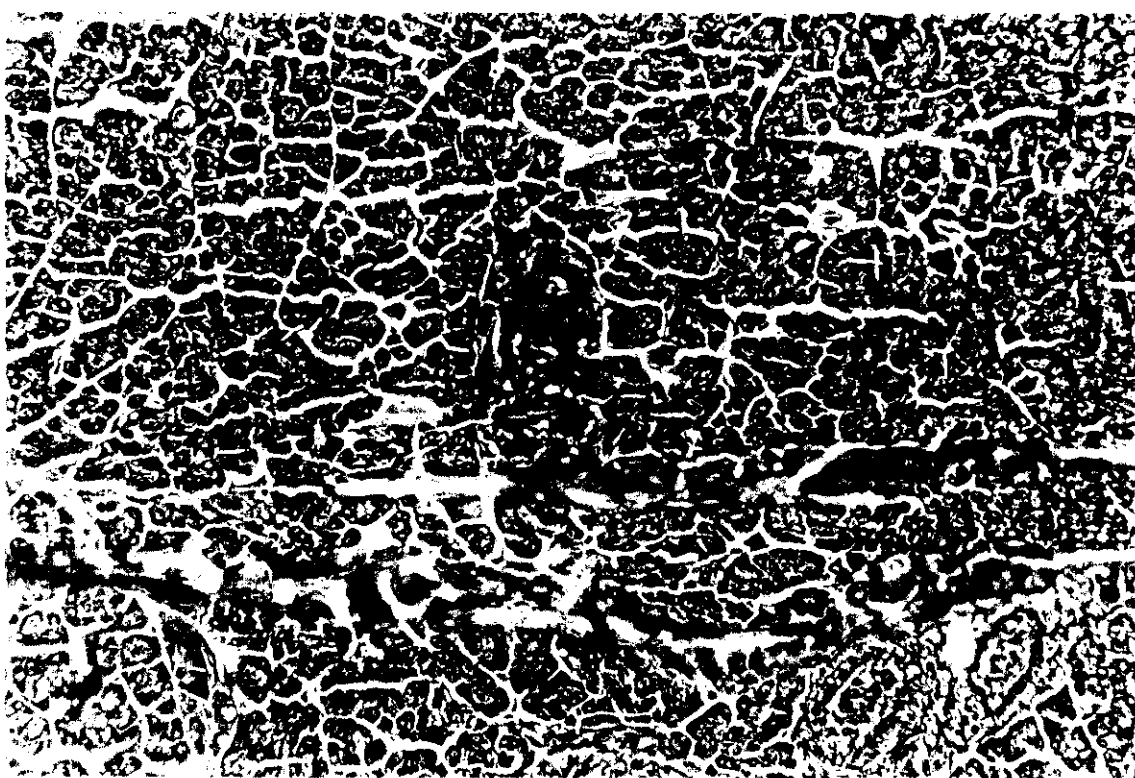


B)

Fig. 21.- *Fotografías realizadas al microscopio óptico de células beta pancreáticas de ratas de 4 días de vida controles (A) y subnutridas (B). X 20.*



A)



B)

Fig. 22.- Fotografías realizadas al microscopio óptico de células beta pancreáticas de ratas de 70 días de vida controles (A) y subnutridas (B). X 20.

Tabla 7.- Porcentaje y masa de células beta pancreáticas de ratas controles y subnutridas de 4 y 70 días de vida. Los valores se presentan como media \pm E.S.

		Porcentaje de células beta (%)	Masa de células beta (mg)
CONTROLES	4 d.v.	2.38 ± 0.11	0.94 ± 0.06
	70 d.v.	0.56 ± 0.03	5.51 ± 0.62
SUBNUTRIDAS	4 d.v.	1.61 ± 0.09^b	0.42 ± 0.04^b
	70 d.v.	0.56 ± 0.02	2.73 ± 0.41^a

^a $p < 0.01$ relativo a las ratas control del mismo día de vida.

^b $p < 0.001$ relativo a las ratas control del mismo día de vida.

frente a las ratas control.

A los 70 días de vida, el porcentaje de células B es similar en las ratas controles y subnutridas; sin embargo, debido al menor peso del páncreas en las ratas subnutridas, la masa total de células B se encontró significativamente disminuida en las ratas subnutridas frente al grupo control (Tabla 7).

3.2.1.9. Conclusiones de los estudios realizados en distintas etapas de la vida de los animales subnutridos desde el último tercio de la gestación hasta la edad adulta.

El estudio sistemático de las alteraciones de la secreción de insulina en animales subnutridos hasta la edad adulta, muestra la alteración de los parámetros estudiados en todas las etapas, mostrando tasas disminuidas tanto *in vivo*, insulina plasmática, como *in vitro*, estimulación de islotes aislados.

A fin de descartar si estas perturbaciones son una consecuencia de la subnutrición en periodos de inmadurez o bien son debidas a procesos adaptativos se realizaron los siguientes experimentos.

3.3. ESTUDIO, EN PERIODO ADULTO, DE LAS CONSECUENCIAS DE DISTINTAS ETAPAS DE SUBNUTRICIÓN DURANTE EL DESARROLLO SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA.

3.3.1. Estudio comparativo en rata adulta de los efectos sobre la secreción de insulina de una subnutrición proteico-calórica en etapa fetal o fetal y lactante.

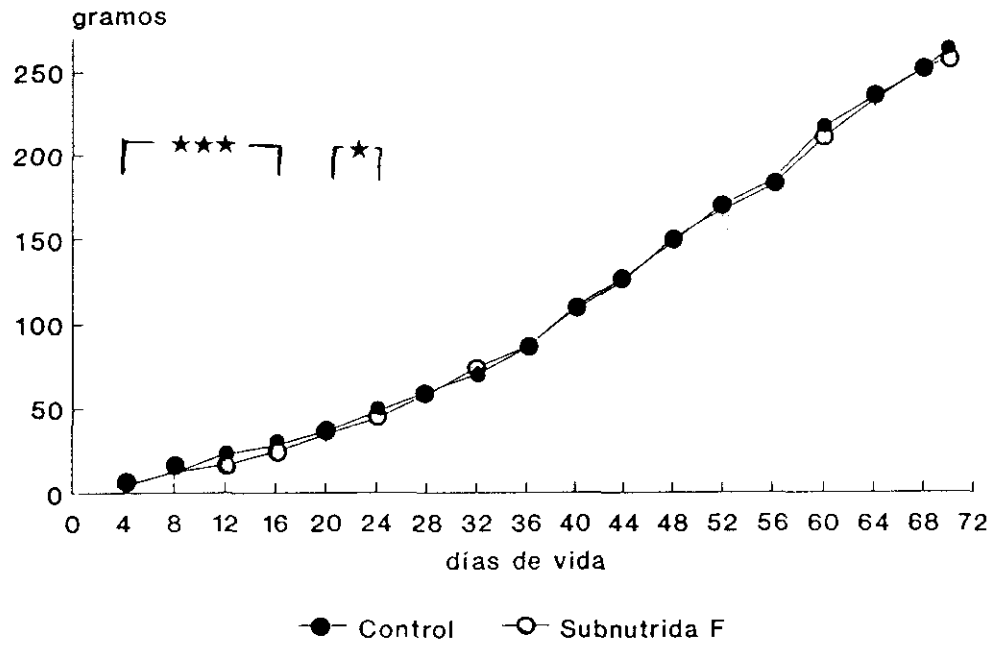
3.3.1.1. Evolución del peso corporal.

Recordemos que, como se mostró en los apartados 3.1.1.3. y 3.2.1.1., los fetos a término de madres subnutridas durante el último tercio de la gestación presentaron un peso de cuerpo significativamente disminuido con respecto a sus controles de la misma edad (5.4 ± 0.05 subnutrido, 4.4 ± 0.03 g control). Por tanto, el peso de partida del grupo subnutrido fue un 20% menor que el del grupo control.

En la Fig. 23A se muestra el incremento de peso corporal de los animales que fueron subnutridos durante la etapa fetal y posteriormente realimentados frente a sus controles. Se puede observar que, a pesar de la realimentación, las ratas subnutridas siguieron mostrando un peso corporal significativamente inferior al de sus controles durante toda la etapa lactante (hasta los 24 días de vida). A partir del destete, los pesos corporales de ambas poblaciones fueron similares no existiendo diferencias significativas en toda la etapa adulta.

En el caso de las ratas subnutridas durante las etapas fetal y lactante (Fig. 23B) las diferencias en el peso corporal entre ambas poblaciones se acentuaron durante la lactancia y, aunque tras la realimentación las ratas subnutridas aumentaron progresivamente de peso, en toda la etapa de estudio éste fue significativamente inferior al de las controles. De esta forma, a los 70 días de vida, el peso de las ratas subnutridas durante las etapas fetal y lactante fue un 27% menor que el de los

Peso corporal



Peso corporal

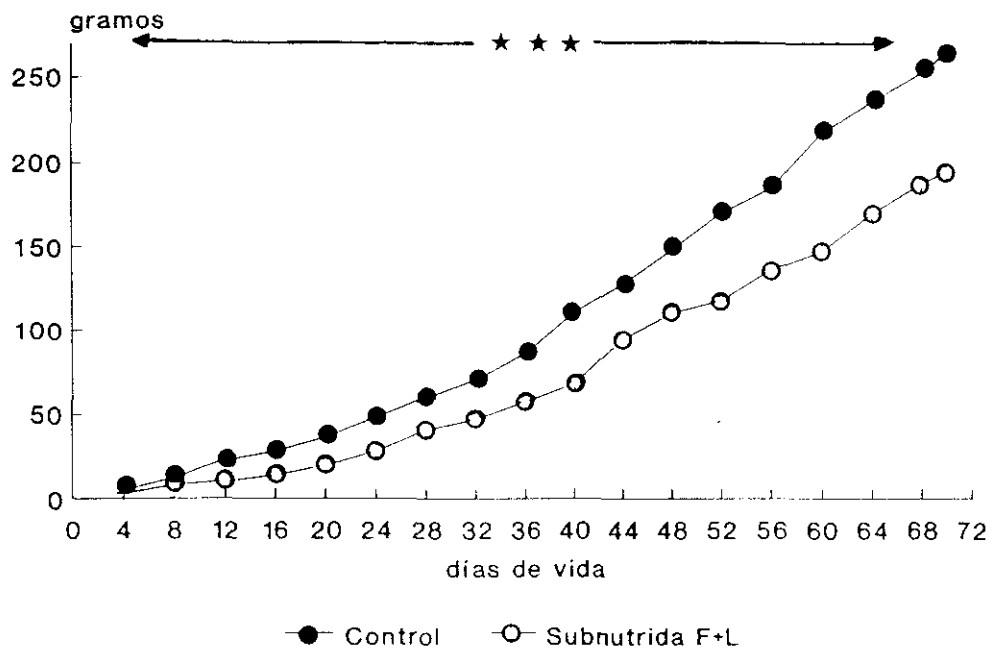


Fig. 23.- Evolución del peso corporal de ratas controles y subnutridas durante la etapa fetal y posteriormente realimentadas (F) y subnutridas durante las etapas fetal y lactante y posteriormente realimentadas (F+L). Media \pm E.S.

animales controles (262.6 ± 1.8 control, 193.5 ± 1.7 g subnutridas F+L).

3.3.1.2. Glucemia, insulinemia y contenido pancreático de insulina en ratas adultas de 70 días de vida.

La glucemia, insulinemia y contenido pancreático de insulina se evaluaron a los 70 días de vida en ratas controles y subnutridas tanto durante la etapa fetal y posteriormente realimentadas (F) como durante las etapas fetal y lactante y posteriormente realimentadas (F+L).

Como se observa en la Tabla 8, ninguna de las condiciones de subnutrición pareció afectar significativamente estos parámetros y los resultados obtenidos en las tres poblaciones fueron similares.

3.3.1.3. Tolerancia a la glucosa en ratas de 70 días de vida en ambas condiciones de subnutrición.

En la Fig. 24A se presenta la evolución de la glucosa plasmática en las ratas controles, subnutridas durante la etapa fetal (F) y subnutridas durante las etapas fetal y lactante (F+L), durante los 30 minutos posteriores a la administración intraperitoneal de una sobrecarga de glucosa.

Se puede observar que las curvas de glucemia fueron similares en las tres poblaciones, aunque los dos grupos de animales subnutridos presentaron en todo momento valores de glucemia significativamente superiores a los del grupo control. A pesar de ello, las respuestas integradas de glucosa no mostraron diferencia alguna entre las ratas control y las subnutridas durante la etapa fetal y durante las etapas fetal y lactante (Fig. 24B).

La variación de la insulina plasmática en todo el periodo de estudio aparece

Tabla 8.- Glucemia, insulinemia y contenido de insulina pancreática de ratas de 70 días de vida, controles, subnutridas F (subnutridas en la etapa fetal y posteriormente realimentados y subnutridos F + L (subnutridas en las etapas fetal y lactante y posteriormente realimentadas). Los resultados se expresan como Media \pm E.S.

	Glucemia (mg/100ml)	Insulinemia (μ u/ml)	Contenido pancreático (U/g páncreas)
Controles	80.1 \pm 1.1	70.7 \pm 4.2	4.71 \pm 0.11
Subnutridas F	83.8 \pm 2.1	75.8 \pm 2.6	4.38 \pm 0.07
Subnutridas F+L	80.3 \pm 1.7	70.4 \pm 2.7	4.33 \pm 0.12

GTT (glucemia)

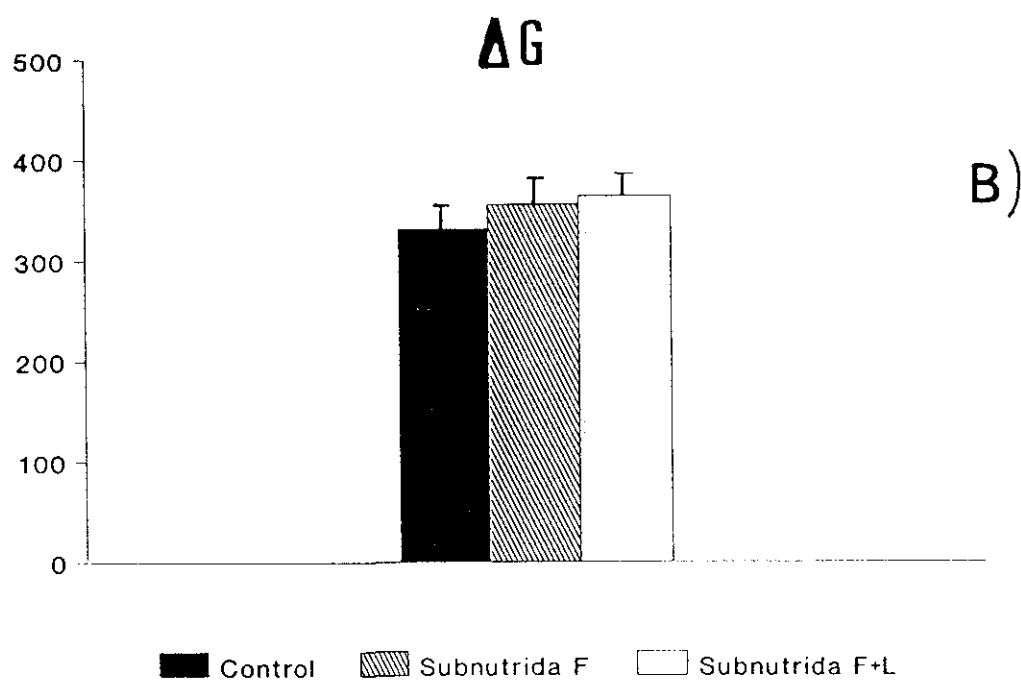
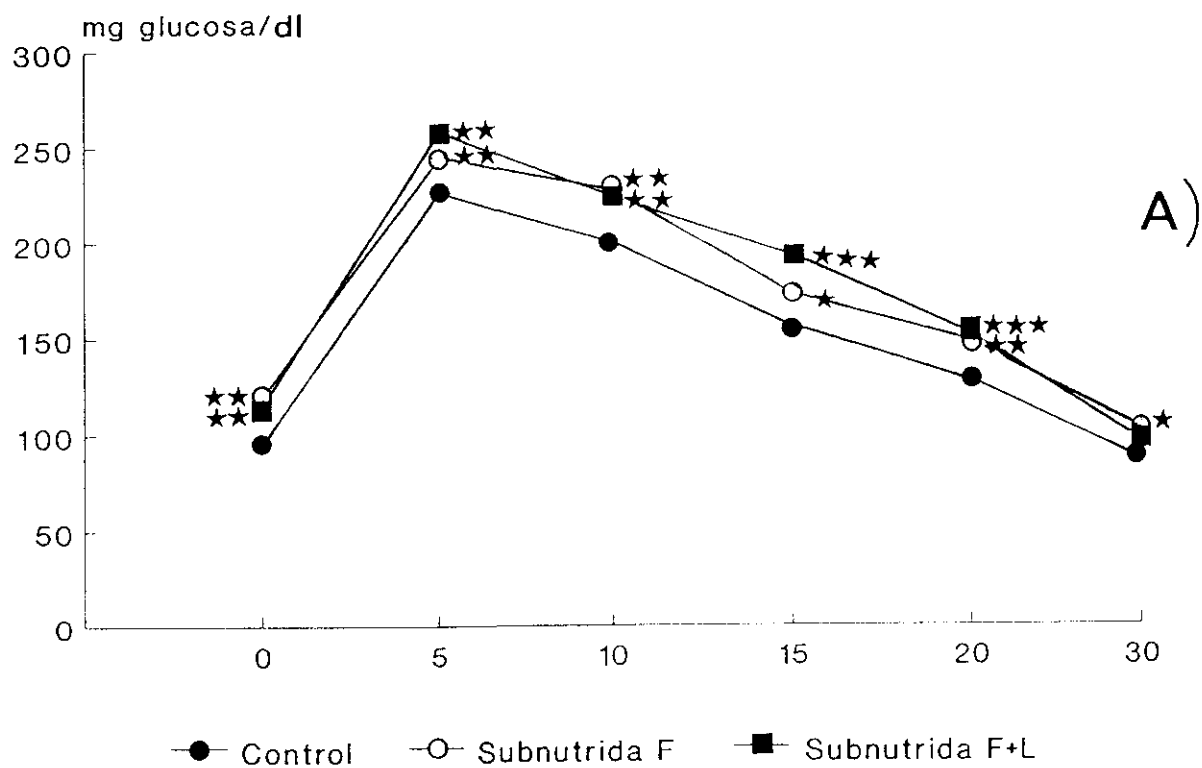


Fig. 24.- Prueba de tolerancia a la glucosa en ratas de 70 días de vida controles, subnutridas F (subnutridas en la etapa fetal y posteriormente realimentadas), y subnutridas F+L (subnutridas en las etapas fetal y lactante y posteriormente realimentadas).

A.- Evolución de la glucemia.

B.- Respuestas integradas de la glucosa (AG).

GTT (insulinemia)

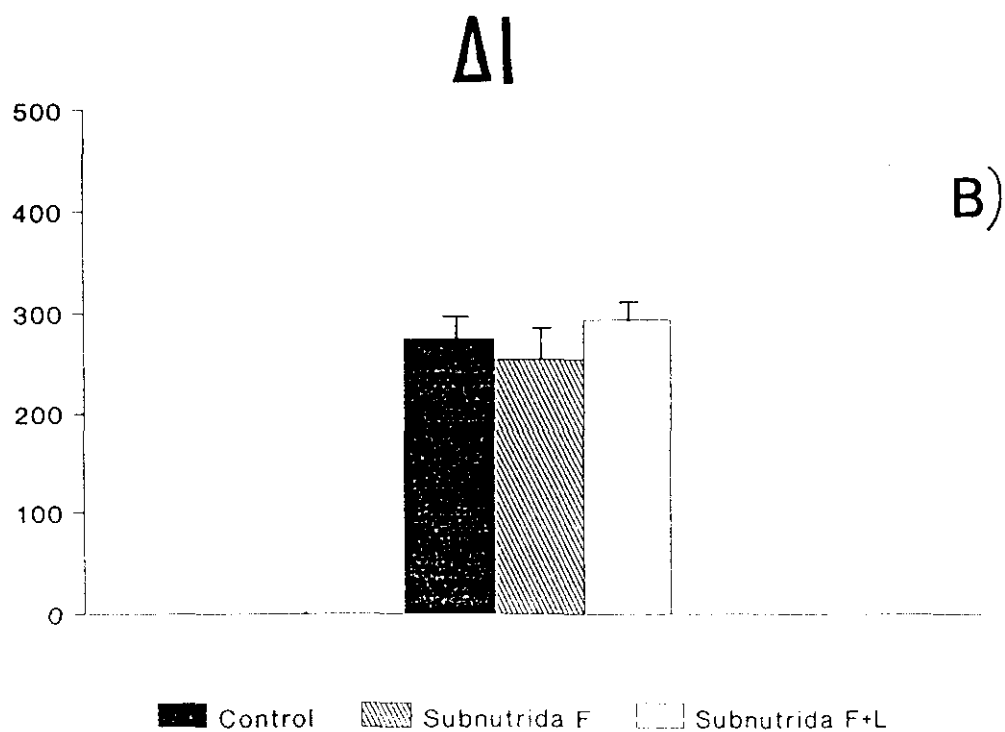
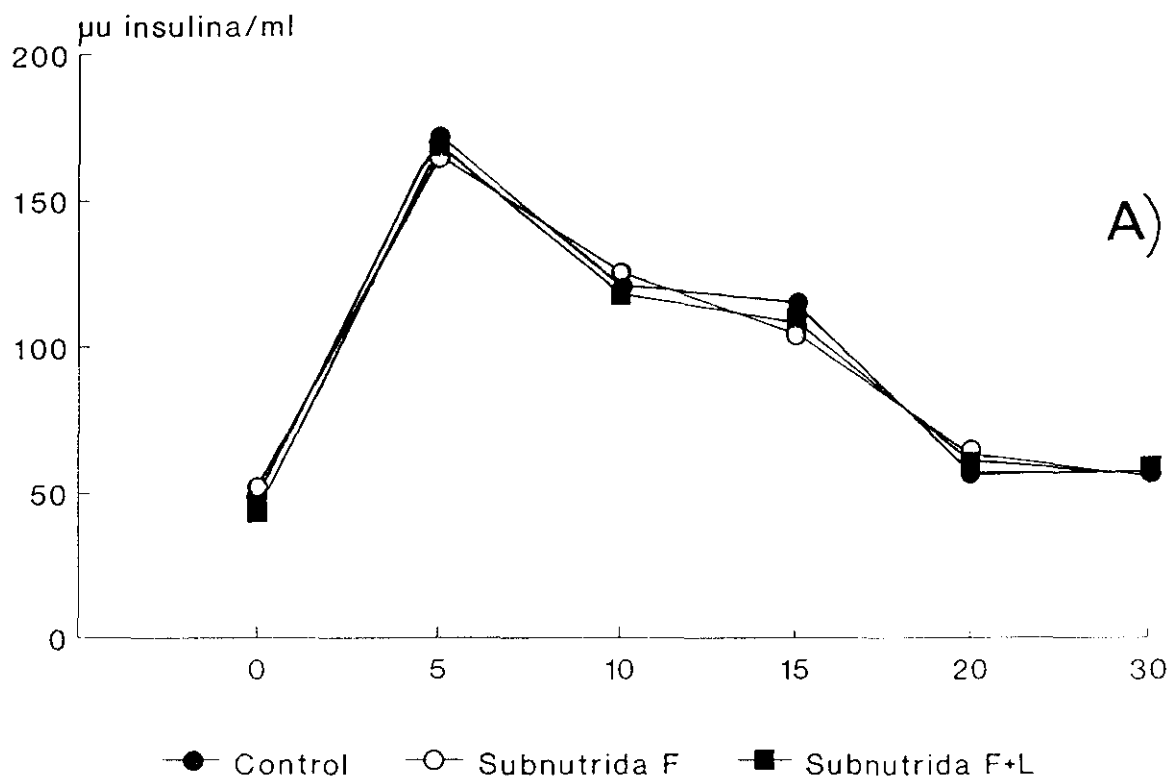


Fig. 25.- Prueba de tolerancia a la glucosa en ratas de 70 días de vida controles, subnutridas F (subnutridas en la etapa fetal y posteriormente realimentadas), y subnutridas F+L (subnutridas en las etapas fetal y lactante y posteriormente realimentadas).

A.- Evolución de la insulinemia.

B.- Respuestas integradas de la insulina (ΔI).

reflejada en la Fig. 25A. Las concentraciones de insulina plasmáticas de partida de las tres poblaciones fueron similares ($49.3 \pm 3.3\mu\text{U/ml}$ control, $51.9 \pm 1.1\mu\text{U/ml}$ subnutrida F, $43.5 \pm 1.2\mu\text{U/ml}$ subnutrida F+L) y la inyección de glucosa provocó un incremento de la hormona en sangre de la misma magnitud en todos los grupos, descendiendo posteriormente por igual; de ahí que la respuesta integrada de insulina (Fig. 25B) en las ratas control y subnutridas F y F+L fuera igual.

El cálculo del índice insulinogénico no mostró diferencias significativas entre los tres grupos de animales considerados (0.86 ± 0.02 control, 0.80 ± 0.04 subnutrida F, 0.85 ± 0.03 subnutrida F+L).

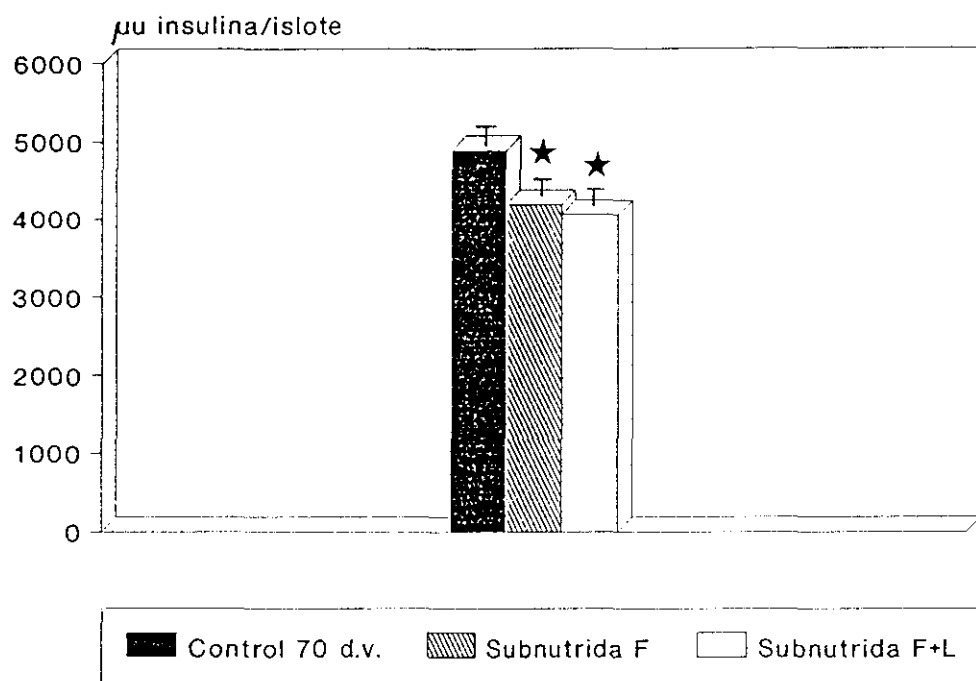
3.3.1.4. Secreción de insulina *in vitro* en ratas de 70 días de vida.

En la Fig. 26a, aparece reflejado el contenido insulínico de los islotes aislados de ratas controles y de ratas subnutridas, tanto en la etapa fetal (F) como en las etapas fetal y lactante (F+L). Como se puede observar, este parámetro es similar en los dos grupos de ratas subnutridas y este valor es significativamente inferior al encontrado en el caso de la población control.

La respuesta insulino-secretora de los islotes de los dos grupos de ratas subnutridas fue similar en todas las condiciones consideradas y en el mismo sentido que los islotes del grupo control (Fig. 26b).

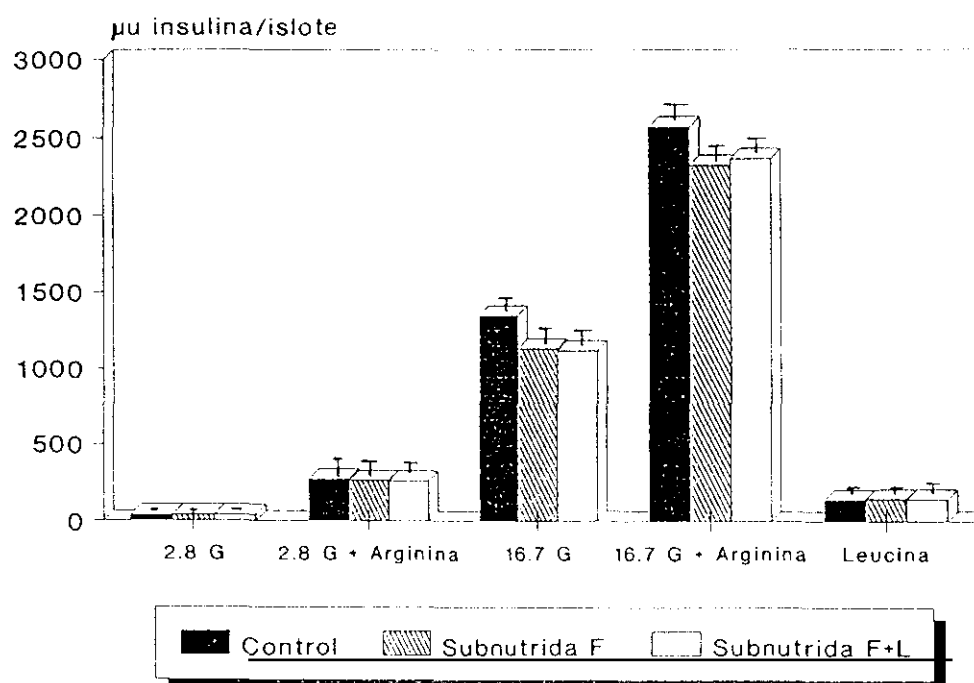
Al expresar el porcentaje de liberación de insulina, solo se observó un aumento significativo de este parámetro en los dos grupos subnutridos frente al control en el caso en el que se estimuló a los islotes con leucina (Tabla 9).

CONTENIDO INSULINICO EN ISLOTES AISLADOS



a)

INSULINO-SECRECION EN ISLOTES AISLADOS



b)

Fig. 26.- a) Contenido de insulina en islotes aislados de ratas de 70 días de vida, controles, subnutridas F (subnutridas en la etapa fetal y posteriormente realimentadas), y subnutridas F+L (subnutridas en las etapas fetal y lactante y posteriormente realimentadas). Media \pm E.S.

b) Efecto de distintos secretagogos sobre la secreción de insulina de islotes aislados de ratas de 70 días de vida, controles, subnutridas F (subnutridas en la etapa fetal y posteriormente realimentadas), y subnutridas F+L (subnutridas en las etapas fetal y lactante y posteriormente realimentadas). Media \pm E.S.

Tabla 9.- Porcentaje de liberación de insulina, en respuesta a distintos secretagogos, en islotes aislados de ratas de 70 días de vida, controles, subnutridas F (subnutridas en la etapa fetal y posteriormente realimentadas) y subnutridas F + L (subnutridas durante las etapas fetal y lactante y posteriormente realimentadas). Media \pm E.S.

	Liberación de insulina (%)		
	Control	Subnutrida F	Subnutrida F+L
2.8 G	0.89 \pm 0.02	0.92 \pm 0.02	0.94 \pm 0.03
2.8 G + Arginina	5.6 \pm 0.5	6.0 \pm 0.4	6.2 \pm 0.5
16.7 G	27.4 \pm 1.3	27.1 \pm 1.1	27.6 \pm 1.4
16.7 G + Arginina	51.9 \pm 2.9	55.1 \pm 2.1	57.0 \pm 1.9
Leucina	2.91 \pm 0.06	3.32 \pm 0.07 ^a	3.40 \pm 0.05 ^a

^a p < 0.05 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

3.3.1.5. Conclusiones generales sobre los resultados obtenidos en etapa adulta subnutriendo los animales en dos etapas distintas del desarrollo: fetal o fetal y lactante.

De los resultados obtenidos se deduce que la subnutrición proteico-calórica producida en etapas de desarrollo no provoca alteraciones que se mantengan en etapa adulta, en cuanto a los parámetros estudiados dirigidos a establecer la secreción de insulina. Las alteraciones encontradas en animales adultos, cuando la subnutrición se continúa desde la etapa fetal hasta el sacrificio del animal adulto, expuesto anteriormente, no pueden achacarse a una especial necesidad de nutrientes durante etapas de desarrollo.

3.4. ESTUDIO DE LAS CONSECUENCIAS DE 4 SEMANAS DE IDENTICA SUBNUTRICIÓN, EN PERIODO ADULTO, SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA.

3.4.1. Evolución del peso corporal.

En la Fig. 27 se muestra la evolución del peso corporal de las ratas controles y de las que fueron subnutridas desde la cuarta hasta la octava semana de vida.

Los pesos de partida de ambas poblaciones a los 28 días de vida fueron similares (59.5 ± 1.7 control, 57 ± 1.5 g subnutrida A). A partir de este momento, las ratas que fueron subalimentadas disminuyeron su peso durante las dos primeras semanas de restricción y lo aumentaron de forma muy lenta en la tercera y cuarta semana de subnutrición. Este hecho provocó que durante todo el periodo las ratas subnutridas presentaran un peso corporal significativamente inferior al del grupo control, siendo a los 56 días de vida sólo el 51% del peso control (183.8 ± 1.4 control, 94.8 ± 2.4 g subnutrida A).

3.4.2. Evolución de la glucemia, insulinemia y contenido pancreático de insulina en ratas adultas subnutridas cuatro semanas.

El estudio de la evolución de la glucemia, insulinemia y contenido pancreático de insulina se realizó entre la cuarta y octava semana de vida. En este periodo de estudio los datos se tomaron a los 28, 35, 42, 49 y 56 días de vida y los resultados que se obtuvieron aparecen reflejados en la Tabla 10.

La glucemia de partida de ambos grupos, control y subnutrido en etapa adulta (A), fue similar y se mantuvo sin diferencias hasta los 56 días de vida, momento en el que la concentración de glucosa en sangre del grupo subnutrido fue significativamente inferior con respecto al control de la misma edad.

Peso corporal

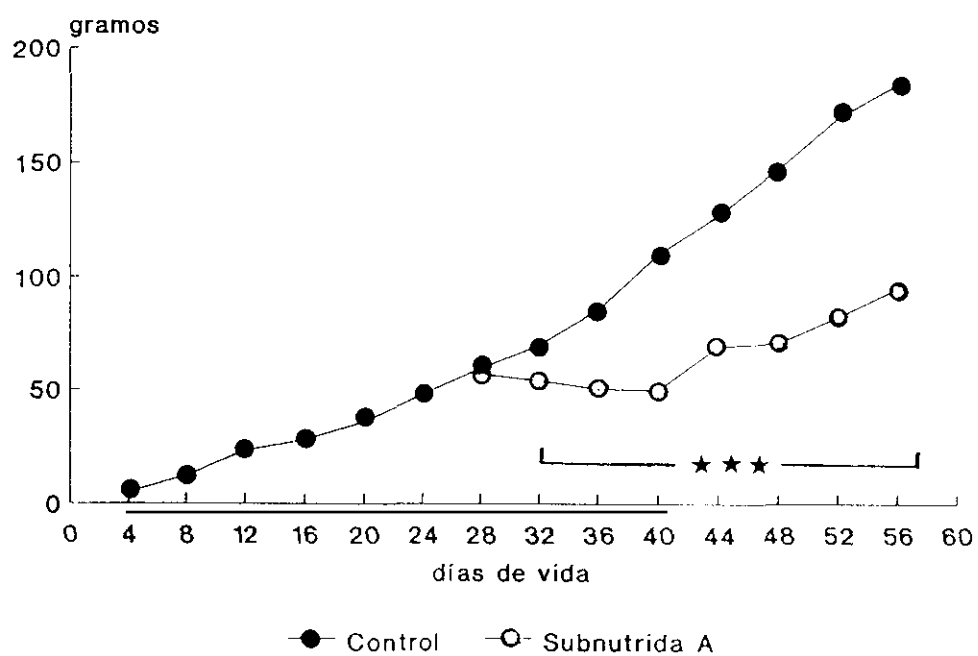


Fig. 27.- Evolución del peso corporal de ratas controles y subnutridas A (subnutridas entre la 4ª y 8ª semana de vida). Media \pm E.S.

Tabla 10.- Glucemia, insulinemia y contenido de insulina pancreática a los 28, 35, 42, 49 y 56 días de vida en ratas controles y subnutridas A (subnutridas entre la 4ª y 8ª semana de vida). Media \pm E.S.

		Glucemia (mg/100ml)	Insulinemia (μ u/ml)	Contenido pancreático (U/g páncreas)
Control	28	83.2 \pm 0.8	42.9 \pm 3.3	4.31 \pm 0.11
	35	86.2 \pm 2.1	45.0 \pm 3.3	4.26 \pm 0.23
	42	85.3 \pm 1.4	50.6 \pm 2.2	4.41 \pm 0.09
	49	87.2 \pm 0.9	49.7 \pm 2.7	4.62 \pm 0.12
	56	85.3 \pm 1.2	50.7 \pm 4.2	4.71 \pm 0.13
Subnutrida A	28	84.1 \pm 1.2	42.7 \pm 2.2	4.32 \pm 0.12
	35	90.2 \pm 3.1	45.4 \pm 1.7	4.17 \pm 0.04
	42	86.2 \pm 2.2	42.9 \pm 2.0 ^b	4.16 \pm 0.10
	49	82.3 \pm 1.5	41.1 \pm 2.1 ^b	4.01 \pm 0.05 ^a
	56	71.1 \pm 0.5 ^c	40.7 \pm 1.8 ^c	3.65 \pm 0.13 ^c

^a p < 0.05 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

^b p < 0.01 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

^c p < 0.001 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

Como en el caso de la glucemia, la concentración de insulina plasmática de partida fue similar en ambos grupos. En los animales control el valor de la insulinemia aumentó hasta los 42 días de vida y se mantuvo hasta los 56. Cuando se compararon entre sí las dos poblaciones, este parámetro se encontró significativamente disminuido a los 42, 49 y 56 días de vida, en las ratas que fueron subnutridas entre la cuarta y octava semana de vida.

El contenido pancreático de insulina no varió a lo largo del periodo de estudio en las ratas controles y se encontró disminuido significativamente en las ratas subnutridas A en los días 49 y 56 de vida.

3.4.3. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratas de 56 días de vida subnutridas cuatro semanas previas.

La evolución de la glucemia durante la prueba de tolerancia practicada en las dos poblaciones de animales, controles y subnutridas en la etapa adulta, se muestra en la Fig. 28A.

Como se observa, los valores basales de glucemia fueron similares en las ratas controles y subnutridas adultas. La administración de la sobrecarga de glucosa indujo una elevación de la glucemia que a los cinco minutos fue ligeramente superior en las ratas subnutridas. A los diez minutos, mientras que en las ratas controles la glucemia disminuyó, se mantuvo alta en las ratas subnutridas con lo que los valores en este tiempo fueron significativamente superiores en esta última población de animales.

La respuesta integrada de glucosa (Fig. 28B) fue significativamente superior en las ratas que fueron subnutridas durante la cuarta y octava semana de vida (320.1 ± 13.3 control, 368.2 ± 17.6 subnutrida A).

GTT (glucemia)

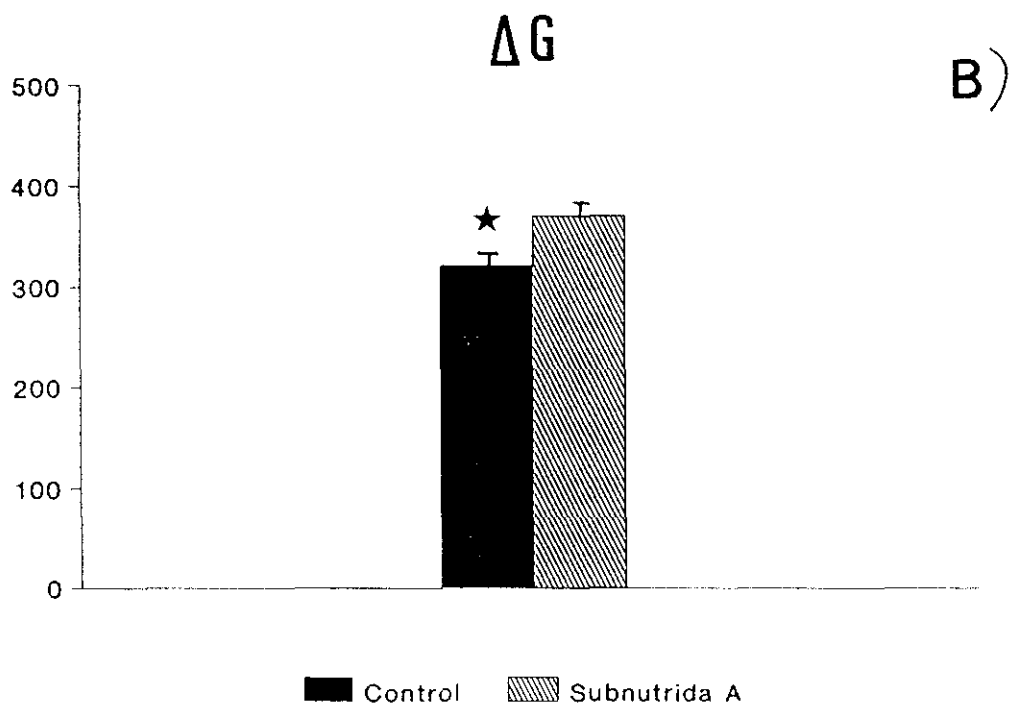
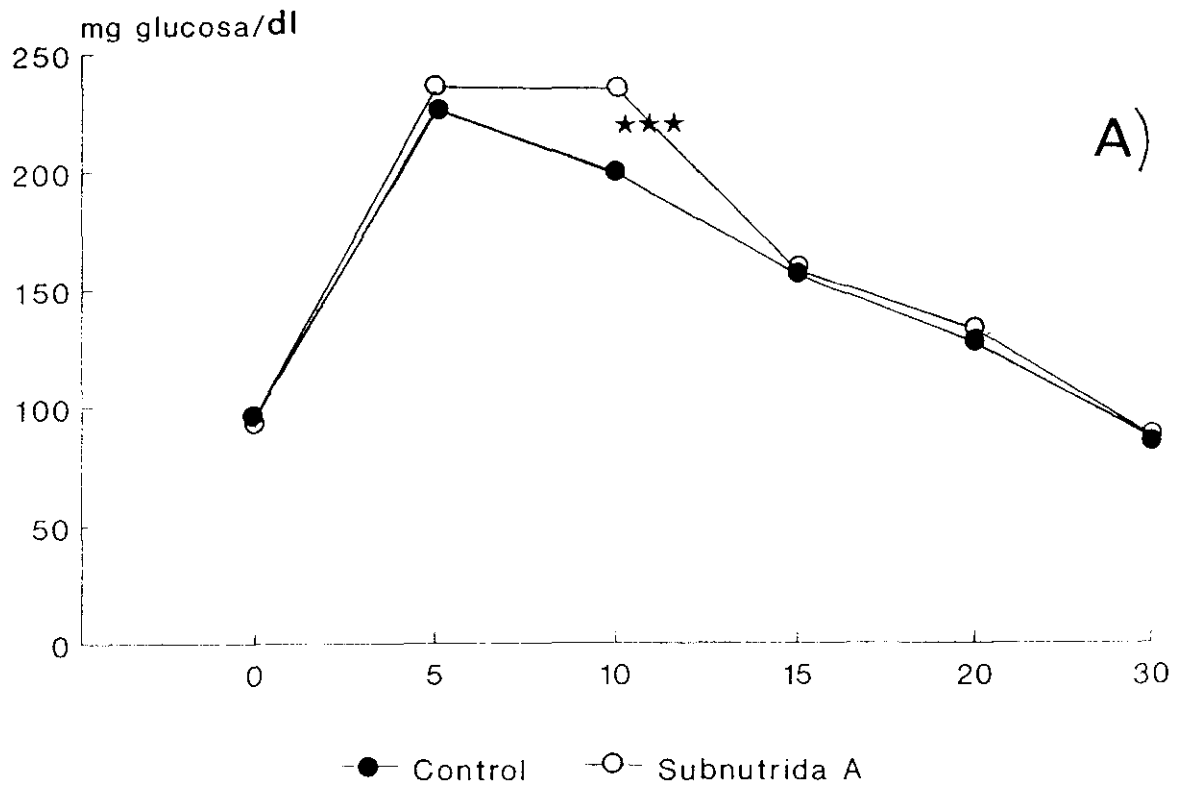


Fig. 28.- Prueba de tolerancia a la glucosa en ratas de 56 días de vida controles y subnutridas A (subnutridas entre la 4ª y 8ª semana de vida).
 A.- Evolución de la glucemia.
 B.- Respuestas integradas de la glucosa (ΔG).

GTT (insulinemia)

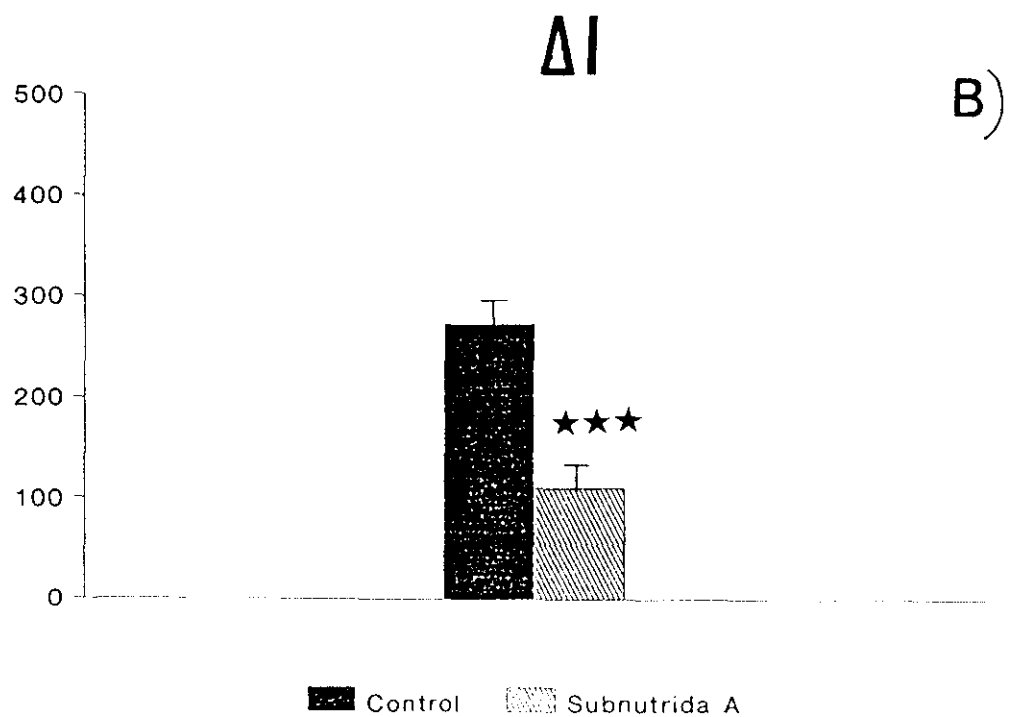
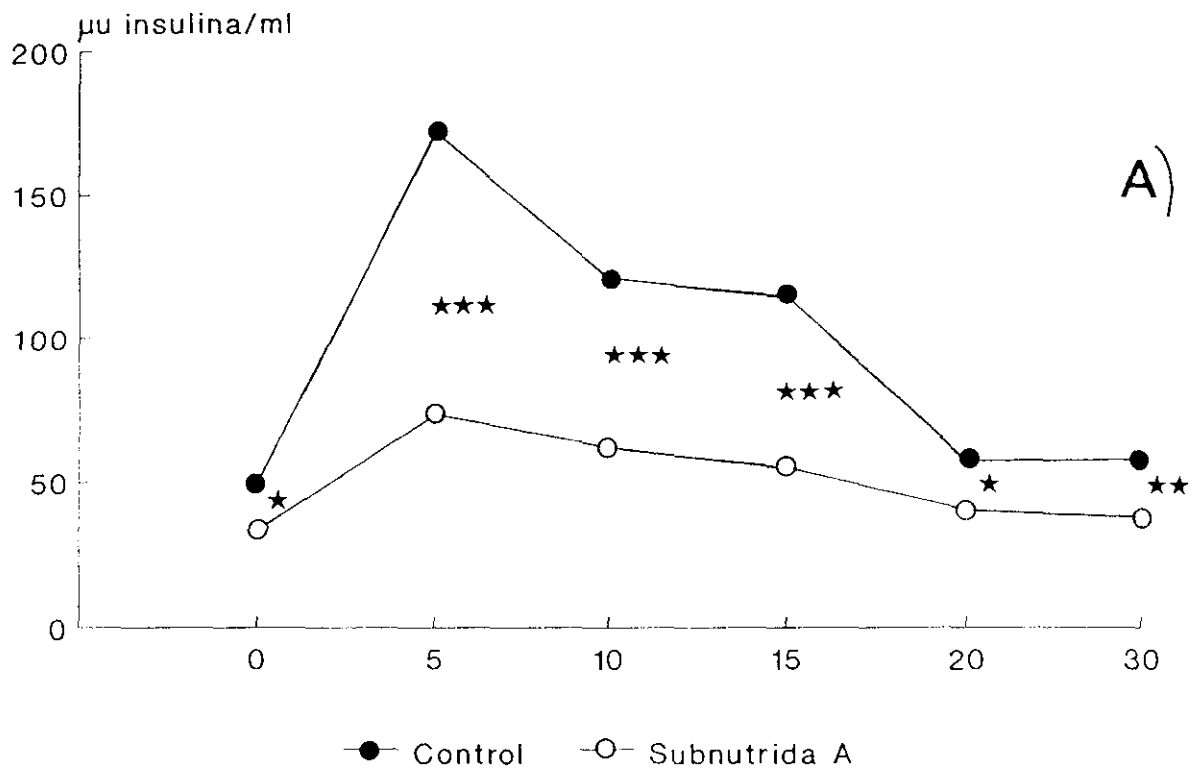


Fig. 29.- Prueba de tolerancia a la glucosa en ratas de 56 días de vida controles y subnutridas A (subnutridas entre la 4ª y 8ª semana de vida).
 A.- Evolución de la insulinemia.
 B.- Respuestas integradas de la insulina (ΔI).

La evolución de la insulina plasmática tras la administración de la glucosa aparece reflejada en la Fig. 29A. Se puede observar que las ratas subnutridas A ya parten de un valor de insulinemia significativamente inferior que el de las controles ($49.3 \pm 3.3 \mu\text{U/ml}$ control, $33.5 \pm 2.9 \mu\text{U/ml}$ subnutridas A). Las ratas controles responden a la sobrecarga de glucosa con un aumento muy marcado en la secreción de insulina a los 5 minutos de la administración; respuesta que fue disminuyendo progresivamente a lo largo del periodo de prueba. Sin embargo, la secreción de la hormona fue muy baja en las ratas subnutridas A, estando en todo momento significativamente por debajo de la respuesta control. De esta forma, al calcular la respuesta integrada de insulina, ésta fue significativamente inferior en las ratas subnutridas A (274.9 ± 20.2 control, 100.6 ± 10.1 subnutrida A) (Fig. 29B).

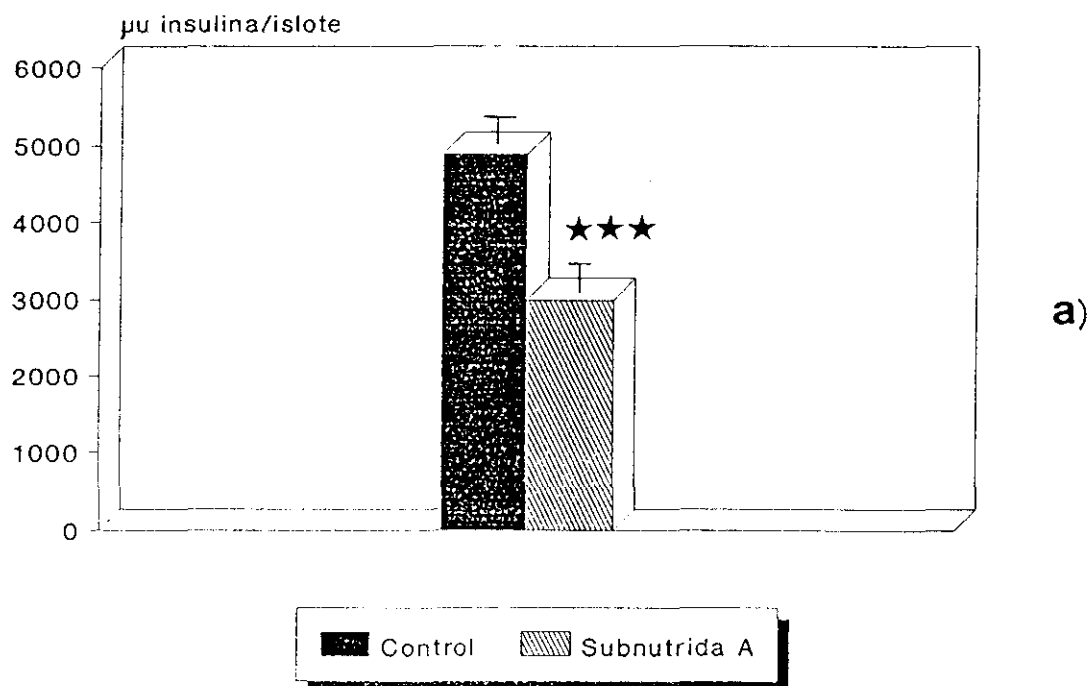
En el mismo sentido, el índice insulinogénico (AI/AG) se encontró significativamente disminuido en las ratas subnutridas frente a los controles (0.86 ± 0.02 control, 0.26 ± 0.06 subnutrida A).

3.4.4. Secreción de insulina *in vitro* en ratas adultas de 56 días de vida subnutridas durante 4 semanas previas.

Cuando se evaluó el contenido de insulina de los islotes aislados de ratas controles y subnutridas A (Fig. 30a), se observó que estaba significativamente disminuido en las ratas restringidas, siendo su valor aproximadamente la mitad de lo encontrado en el grupo control ($4894 \pm 161.8 \mu\text{U}$ insulina/islote control, $2991.6 \pm 115.5 \mu\text{U}$ insulina/islote subnutrida A).

Por su parte, como se observa en la Fig. 30b, los islotes de las ratas subnutridas A mostraron una respuesta insulino-secretora significativamente inferior que los controles en todas las condiciones estudiadas.

CONTENIDO INSULINICO EN ISLOTES AISLADOS



INSULINO-SECRECION EN ISLOTES AISLADOS

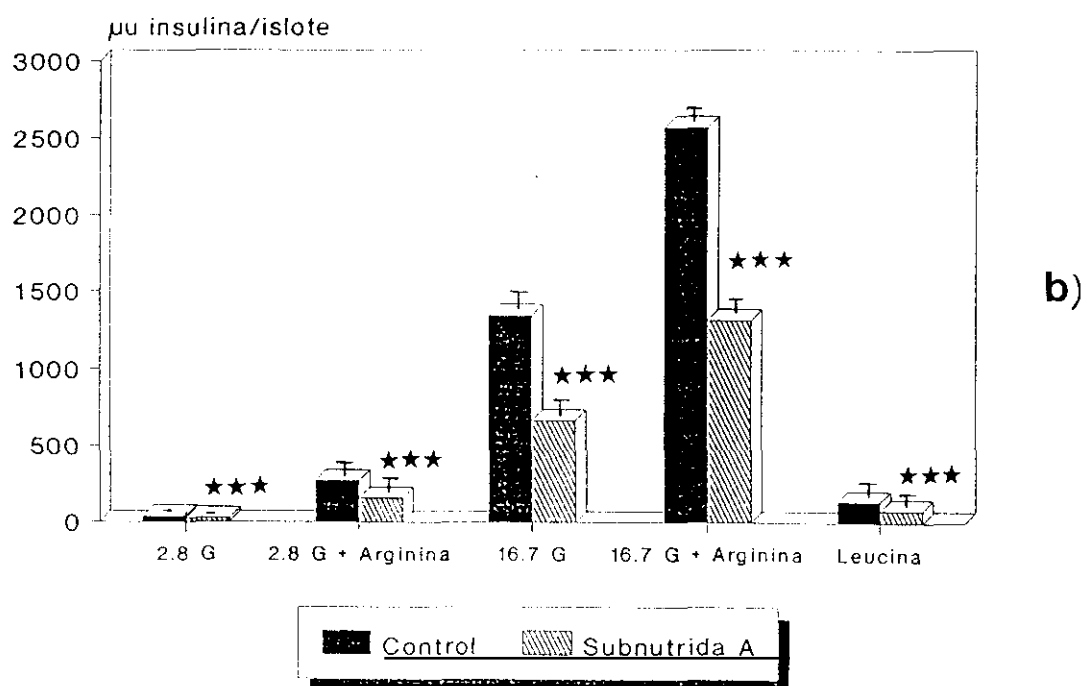


Fig. 30.- a) Contenido de insulina en islotes aislados de ratas de 56 días de vida, controles y subnutridas A (subnutridas durante la 4ª y 8ª semana de vida). Media \pm E.S.
 b) Efecto de distintos secretagogos sobre la secreción de insulina en islotes aislados de ratas de 56 días de vida, controles y subnutridas A (subnutridas entre la 4ª y 8ª semana de vida). Media \pm E.S.

Tabla 11.- Porcentaje de liberación de insulina, en respuesta a distintos secretagogos, en islotes aislados de ratas de 56 días de vida, controles y subnutridas A (subnutridas entre la 4^a y 8^a semana de vida). Media \pm E.S.

	Liberación de Insulina (%)	
	Controles	Subnutridas A
2.8 G	0.89 \pm 0.02	0.90 \pm 0.03
2.8 G + Arginina	5.6 \pm 0.5	5.0 \pm 0.3
16.7 G	27.4 \pm 1.3	22.3 \pm 1.0 ^a
16.7 G + Arginina	51.9 \pm 2.9	44.0 \pm 1.6 ^b
Leucina	2.91 \pm 0.06	2.82 \pm 0.07

^a p < 0.01 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

^b p < 0.001 relativo a las ratas control del mismo día de vida.

Cuando se calculó el porcentaje de liberación de insulina (Tabla 11) se encontró que estaba de igual forma significativamente disminuido en las ratas subnutridas A cuando en el medio de incubación existía glucosa 16mM y glucosa 16mM más arginina 19mM.

3.4.5. Conclusiones de los experimentos realizados subnutriendo animales adultos durante cuatro semanas.

Las pruebas realizadas en animales adultos subnutridos cuatro semanas con subnutrición proteico-calórica y sus controles muestran similares resultados que los encontrados en animales adultos subnutridos desde el periodo gestante en cuanto a su secreción de insulinas e inducen a concluir que las perturbaciones encontradas son una consecuencia de una situación de adaptación funcional a la falta de nutrientes y no a un daño permanente provocado en momentos de inmadurez.

3.5. ESTUDIO DE LAS CONSECUENCIAS DE LA SUBNUTRICION SOBRE LOS NIVELES DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN MADRES Y SUS FETOS Y EN RATAS ADULTAS DE 70 D.V.

3.5.1. Niveles de GLUT-2 en las ratas controles y subnutridas.

La medición cuantitativa de GLUT-2 en los islotes se consiguió mediante Western Blotting de homogenados de islotes (300-500).

El análisis de los niveles de GLUT-2 se realizó en ratas de 70 días de vida controles (C), subnutridas desde la etapa fetal hasta la edad adulta (S), subnutridas sólo en etapa fetal (F), subnutridas sólo en etapa fetal y lactante (FL) y subnutridas sólo en etapa adulta (A). La autorradiografía de las proteínas se muestra en la Fig. 31A y el análisis densitométrico en la Fig. 31B. La principal banda que aparece en el Western tiene un peso molecular aproximado de 54 KDa, que está de acuerdo con la masa molecular estimada del transportador (Thorens y cols., 1990). Aparte de la banda de 54 KDa, aparecen repetidamente otras bandas de peso molecular inferior. Este mismo hecho ha sido observado antes por otros autores (Tal y cols., 1992; Thorens y cols., 1990) y se debe, probablemente, a las especies resultantes de una degradación parcial de GLUT-2 por proteasa. Estas bandas aparecen sólo en islotes no cultivados y las diferencias en el peso molecular de las bandas entre los distintos autores parecen estar relacionadas con las preparaciones de colagenasa utilizadas (Tal y cols., 1992).

La Fig. 31B muestra que los niveles de GLUT-2, expresados como porcentaje relativo al control positivo (que se considera el 100%), fueron similares en todas las poblaciones consideradas. No obstante, el análisis densitométrico fue sólo la media de dos experimentos independientes.

En el caso de las madres gestantes controles (MC) y (MSN) y de sus fetos

GLUT-2 EN RATAS ADULTAS DE 70 D.V.

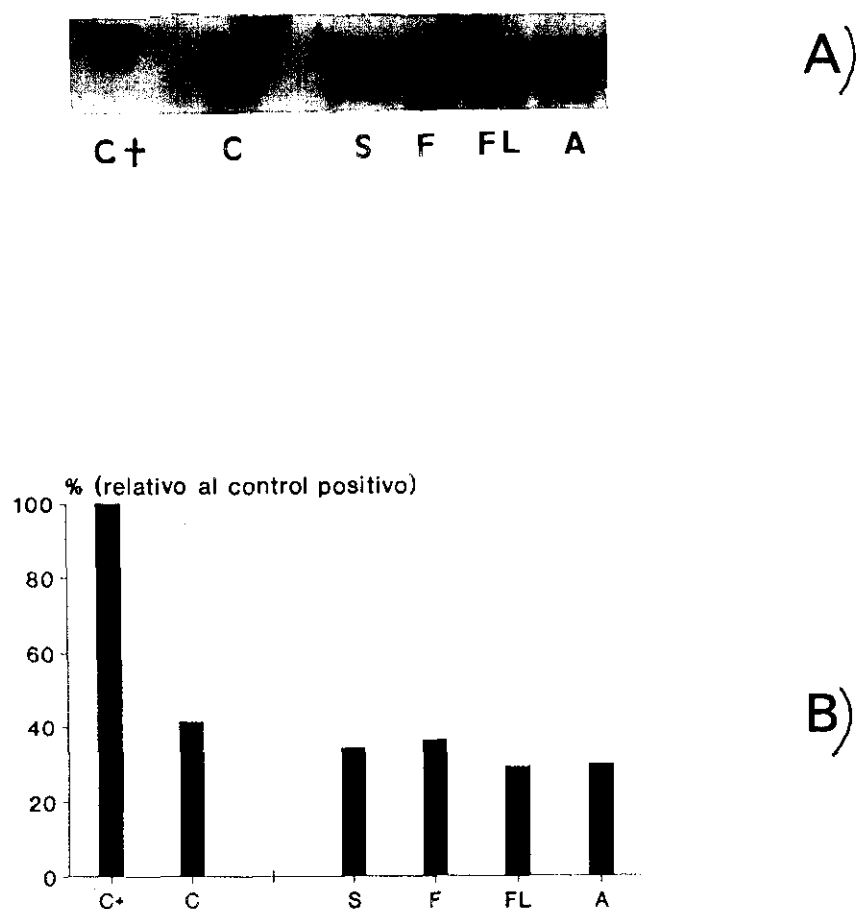


Fig. 31.- A) Análisis mediante Western blotting de los niveles de proteína Glut-2 en islotes aislados de ratas de 70 d.v. controles (C), subnutridas desde la etapa fetal hasta la edad adulta (S), subnutridas sólo en etapa fetal (F), subnutridas sólo en etapa fetal y lactante (FL) y subnutridas sólo en etapa adulta (A). Cada línea de muestra fue cargada con 30µg de proteína. Para el control positivo, que aparece a la izquierda de la película, se depositaron 10µg.
B) Análisis densitométrico de los niveles de Glut-2 de las mismas poblaciones. Los resultados aparecen expresados como tanto por ciento del control positivo (considerado el 100%).

GLUT-2 EN MADRES Y FETOS DE 21 D.D.G.

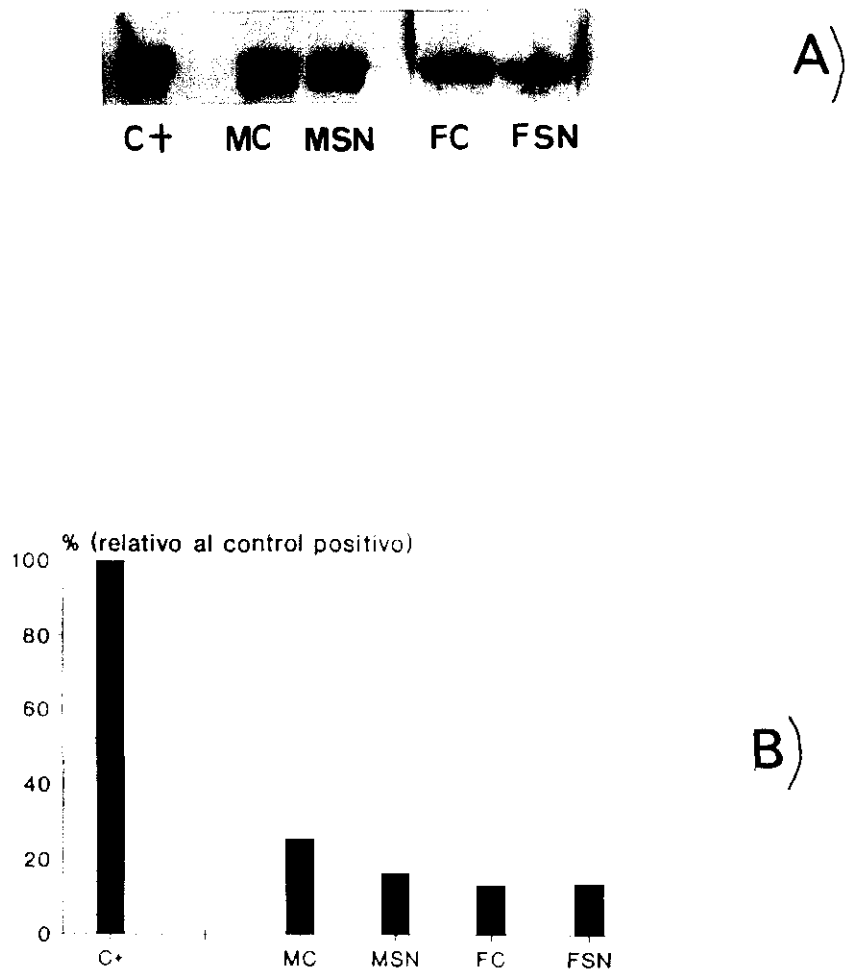


Fig. 32.- Análisis mediante Western blotting de los niveles de proteína Glut-2 en islotes aislados de madres gestantes de 21 días, controles (MC) y subnutridas (MSN), y de sus fetos de la misma edad: fetos de 21 días de gestación de madre control (FC) y fetos de madre subnutrida (FSN). Cada línea fue cargada con 30µg de proteína. Para el control positivo, que aparece a la izquierda de la película se depositaron 10µg.

B) Análisis densitométrico de los niveles de Glut-2 de las mismas poblaciones. Los resultados aparecen expresados como tanto por ciento del control positivo (que se considera el 100%).

(FC y FSN, respectivamente) (Fig. 32) tampoco se encontraron diferencias en los niveles del transportador GLUT-2. Se puede observar (Fig. 32A) cómo en los fetos, controles y subnutridos, no aparecen las bandas de menor peso molecular; se debe, a que los islotes son cultivados durante 5-7 días. El análisis densitométrico (Fig. 32B) fue la media de dos experimentos independientes.

3.5.2. Niveles de GLUT-1 en las ratas controles y subnutridas.

En la Fig. 33 se muestran los niveles de GLUT-1 encontrados en las ratas de 70 días de vida controles (C), subnutridas desde la etapa fetal hasta la edad adulta (S), subnutridas sólo en etapa fetal (F), subnutridas en etapa fetal y lactante (FL) y subnutridas sólo en etapa adulta (A). Los resultados del Western indican que existe una baja expresión de GLUT-1 en los islotes aislados no cultivados. Aunque parece mostrarse una tendencia a estar aumentado en cualquiera de las condiciones de subnutrición, no se pueden obtener conclusiones definitivas debido a que los porcentajes encontrados (con respecto al control positivo que se considera el 100%) sólo corresponden a la medida de dos experimentos independientes (Fig. 33B).

Resultados similares se obtuvieron en las madres gestantes de 21 días, controles (MC) y subnutridas (MSN) (Fig. 34), en dos experimentos independientes.

En el caso de los fetos, controles (FC) y subnutridos (FSN), no se pudo detectar GLUT-1 (Fig. 34A) debido, probablemente, a que se depositaron sólo 20 μ g de proteína frente a los 60 μ g utilizados en el resto de las poblaciones.

GLUT-1 EN RATAS ADULTAS DE 70 D.V.

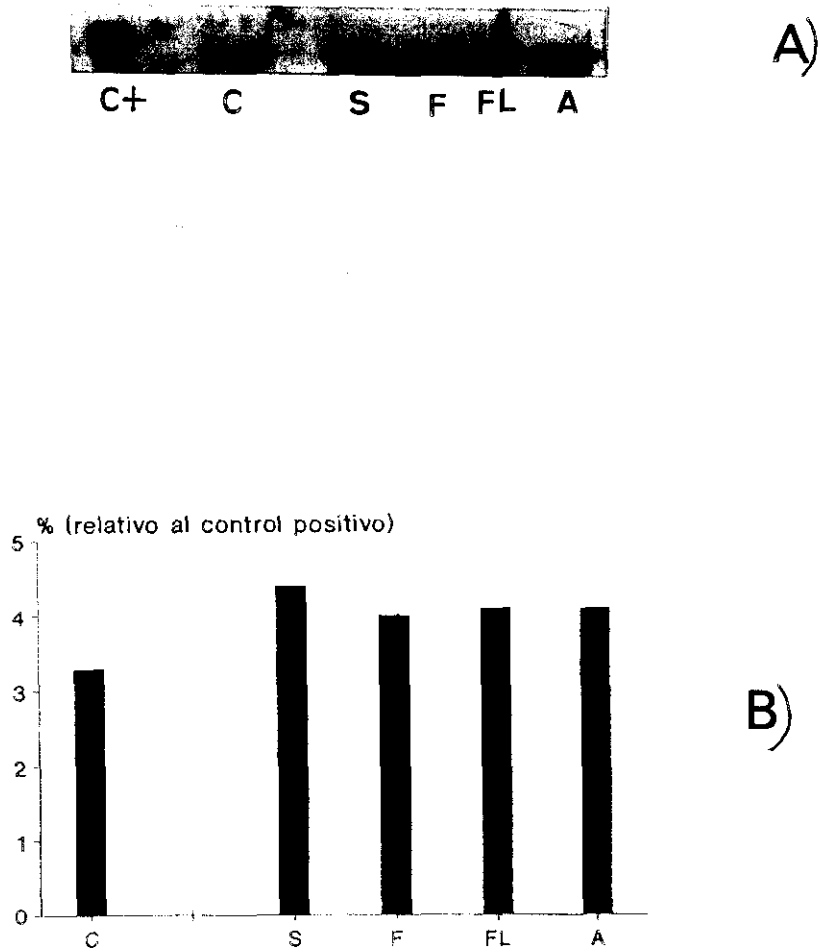


Fig. 33.- A) Análisis mediante Western blotting de los niveles de proteína Glut-1 en islotes aislados de ratas de 70 d.v. controles (C), subnutridas desde la etapa fetal hasta la edad adulta (S), subnutridas sólo en etapa fetal (F), subnutridas sólo en etapa fetal y lactante (FL) y subnutridas sólo en etapa adulta (A). Cada línea de muestra fue cargada con 60µg de proteína. Para el control positivo, que aparece a la izquierda de la película, se depositaron 10µg.
B) Análisis densitométrico de los niveles de Glut-1 de las mismas poblaciones. Los resultados aparecen expresados como tanto por ciento del control positivo (considerado el 100%).

GLUT-1 EN MADRES Y FETOS DE 21 D.D.G.

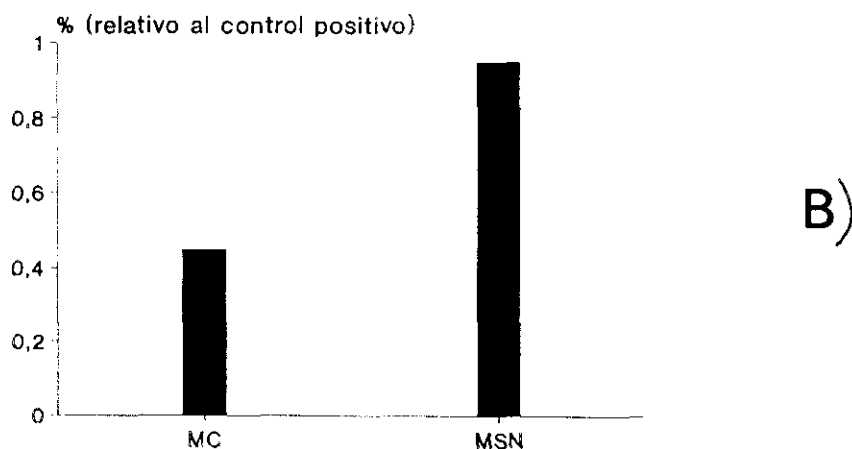


Fig. 34.- Análisis mediante Western blotting de los niveles de proteína Glut-1 en islotes aislados de madres gestantes de 21 días, controles (MC) y subnutridas (MSN), y de sus fetos de la misma edad: fetos de 21 días de gestación de madre control (FC) y fetos de madre subnutrida (FSN). La cantidad de proteína depositada en el caso de las madres gestantes fue de 60 μ g, mientras que para los fetos se emplearon 20 μ g de proteína. Para el control positivo, que aparece a la izquierda de la película se depositaron 10 μ g.

B) Análisis densitométrico de los niveles de Glut-1 de madres gestantes de 21 días controles (MC) y subnutridas (MSN). Los resultados aparecen expresados como tanto por ciento del control positivo (que se considera el 100%).

DISCUSION

4. DISCUSION

4.1. ESTABLECIMIENTO DEL PERIODO CLAVE DE SUBNUTRICION EN LA ETAPA FETAL QUE PROVOCA UNA MAYOR PERTURBACION DE LA SECRECION DE INSULINA.

Desde hace tiempo en nuestro grupo de investigación se trabaja con un modelo de subnutrición (Rodríguez, 1990; Aláez, 1992; Cacho, 1993; Rivero, 1994) que conjuga dos características: a) logra una deficiencia nutricional proteico-energética global y b) comienza la restricción en una etapa precoz del desarrollo.

Aunque algún grupo ha descrito modelos en los que la subnutrición abarca toda la etapa gestante (Snoeck y cols, 1990), la imposibilidad de obtener un número aceptable de fetos al nacimiento y en condiciones óptimas y repetitivas, llevó a nuestro grupo a establecer el comienzo de la restricción en el día 16 de gestación. Probablemente, la subnutrición durante toda la gestación impide el incremento de reservas energéticas que ocurre en las etapas previas al último tercio de la gestación (López-Luna y cols., 1986), lo que conduce a la reabsorción de los fetos (Pond y Mersmann, 1988; Galler y Propert, 1981). A partir del día 16 de gestación, en la rata se producen dos hechos fisiológicos que pueden ser afectados por la subnutrición: 1) se incrementan las necesidades de sustratos para lograr un rápido crecimiento de la unidad feto-placentaria (Herrera, 1988) y 2) el páncreas experimenta cambios importantes que conducen al inicio de su actividad secretora de insulina (Portha, 1990).

Aunque es de esperar que esta subnutrición, comenzada al final de la gestación, lleve a alteraciones de la homeostasis glucídica en los animales, antes de comenzar este trabajo, decidimos comprobar experimentalmente en que periodo de la gestación se alteraban más las condiciones del páncreas de las madres y crías

subnutridas. Para ello, estudiamos el efecto que provocaba restringir la alimentación en los distintos tercios de la gestación sobre parámetros básicos de la función pancreática de las madres subnutridas y de sus fetos.

4.1.1. Efecto de la subnutrición sobre el incremento de peso corporal de las madres durante la gestación.

La gestación en el metabolismo materno supone la adaptación a un estado de aumento de la demanda de sustratos energéticos para el feto. Esta demanda va a llevar al incremento, por parte de la madre, de la ingesta calórica, hiperinsulinemia, resistencia periférica a la insulina e hipertrofia de los islotes pancreáticos (Parson y cols., 1992). Todos estos cambios adaptativos de la madre tienen como propósito la utilización de lípidos como sustratos alternativos en vez de interrumpir el flujo de glucosa y aminoácidos al feto. Durante la vida intrauterina, el transporte de sustratos de la madre al feto va a depender de la concentración de sustratos en sangre de la madre y de la permeabilidad de la placenta a dichos sustratos (Girard y Ferre, 1982). Los sustratos incorporados por el feto sirven para aumentar su masa corporal, como fuente de energía para el metabolismo fetal y como reserva (Mayor y Cuezva, 1985). Por tanto, debido a que el ambiente nutricional del feto es esencial para el crecimiento podemos suponer que cualquier desequilibrio en la disponibilidad de nutrientes durante la gestación, como es la malnutrición o subnutrición, podría modificar dramáticamente el desarrollo fetal (Snoeck y cols., 1990).

El incremento de la masa corporal de la madre durante la gestación no corresponde únicamente a las estructuras feto-placentarias. La madre va a acumular una considerable proporción de reservas energéticas, siendo el principal componente de este acúmulo las grasas corporales, que en la rata llegan a constituir el 21% de

todo el peso que gana durante la gestación (López-Luna y cols., 1986). El aumento de estas reservas tiene lugar durante los dos primeros tercios de la gestación antes de que comience el crecimiento del conjunto feto-placentario; en el último tercio se produce el mayor incremento de peso materno y un intenso drenaje de metabolitos hacia el feto para garantizar el rápido desarrollo y aumento de peso fetal (Beaton y cols., 1954). Todos estos cambios van a estar regidos por variaciones en la ingesta y cambios hormonales (Herrera, 1988).

Los resultados que se presentan muestran que el peso diario ganado por las madres se encontró afectado en los tres modelos de subnutrición considerados (Fig. 6). En la mayoría de los estudios, el crecimiento de las ratas se encuentra disminuido por una deficiencia proteica o cuando la comida está disminuida (Wunderlich y cols., 1979; Levine y cols., 1983; Rodrigues y cols., 1985; Swenne y cols., 1987; Snoeck y cols., 1990). En el caso de las madres subnutridas en el primer tercio de la gestación la disminución en el peso corporal se recupera en el último tercio de la gestación, probablemente porque en esta etapa es cuando se produce el mayor incremento corporal en la rata gestante y una resistencia a la insulina aumentada (Martin y cols., 1986). Esto no ocurre cuando se subnutre en el segundo o tercer tercio. Aunque parece que la última etapa de la gestación es la de mayor importancia para el crecimiento del feto, es de señalar que la imposibilidad de un adecuado incremento de las reservas energéticas en la madre durante los dos primeros tercios de la gestación, la compromete durante la última fase, y ello ha de repercutir incluso en la disponibilidad de sustratos al feto (Bonet y Herrera, 1988). De hecho, como se vió en la sección 3.1.3., los fetos a término de las madres subnutridas en los distintos tercios de la gestación presentaron menor peso corporal que los respectivos controles.

4.1.2. Efecto de la subnutrición sobre varios parámetros en la madre gestante.

Durante la última fase de la gestación, los niveles de glucosa circulantes disminuyen en la madre (Herrera, 1988). Parece ser que el aumento de la transferencia placentaria de glucosa supera con creces a la de otros metabolitos y este activo drenaje de glucosa hacia el feto no parece ser compensado por el aumento en la gluconeogénesis (Herrera y cols., 1969), lo que da lugar a la hipoglucemia materna. Como se observa en la Fig. 7a, la glucemia no se afectó en ninguno de los casos considerados en comparación con el grupo control. Lo mismo ocurre en el caso de la insulinemia (Fig. 7b) y la concentración de insulina pancreática (Fig. 7c). Parece ser que la restricción de ingesta de las madres según nuestro modelo experimental es insuficiente, en cuanto a magnitud o duración, para incidir sobre estos parámetros en las madres gestantes, ello repercute en la consecución de fetos en buenas condiciones.

Durante el curso de la gestación, el requerimiento de insulina aumenta progresivamente. Como previamente ha sido descrito por Leturque y cols. (1984) la insulinemia en la rata madre gestante a los 21 días fue superior a la que presentan los animales vírgenes (Fig. 7b). Esta hiperinsulinemia ha sido relacionada con factores dietarios, es decir, con la hiperfagia propia del final de la gestación (Bourne y cols., 1978); parece ser que los componentes de la ingesta que más influencia tienen al respecto son los glucídicos (Green y Taylor, 1974). El incremento de los niveles de insulina circulante en la madre la capacita para compensar eficazmente la intensa extracción de metabolitos por la unidad feto-placentaria y ello ocurre a pesar de la aumentada resistencia insulínica. A esta resistencia contribuyen, a su vez, factores tanto hormonales como metabólicos en la circulación materna (Herrera, 1988).

Según algunos autores, la concentración pancreática de insulina no varía durante la gestación, pero a lo largo de la misma se produce un incremento del tamaño del páncreas y, en consecuencia, de su contenido insulínico total (Rishi y cols., 1969). Nosotros, sin embargo, encontramos que la concentración de insulina pancreática en las madres el día 21 de gestación (Fig 7c) se encontraba aumentada con respecto al valor de las ratas vírgenes en cualquiera de las condiciones consideradas. Malaisse y cols. (1969) observaron también un pequeño pero significativo incremento de la concentración de insulina pancreática en los días 15 y 20 de gestación y no encontraron cambios en el peso del páncreas. Este hecho implica que el páncreas está sintetizando y/o acumulando más insulina (Rishi y cols., 1969), lo que estaría en consonancia con los cambios descritos en el páncreas endocrino de la madre como adaptación a la mayor demanda de nutrientes: aumento de la secreción de insulina en respuesta a glucosa y disminución del umbral de estimulación de la glucosa (Green y Taylor, 1972; Sorenson y Parson, 1985), aumento de la síntesis de la hormona (Bone y Taylor, 1976) y aumento de la proliferación de células B y del volumen de los islotes (Hermann, 1960; Aerts y Van Assche, 1975).

4.1.3. Efecto de la subnutrición sobre el peso del cuerpo y del páncreas fetal.

Como se ha mostrado en la Fig. 8a, la disminución de la ingesta en las madres en cualquiera de las etapas de la gestación, provocó un menor tamaño de los fetos a término. Es bien sabido que existe una relación entre la nutrición materna y el peso al nacimiento de las crías (Koski y Hill, 1990). Los niños nacidos de madre con subnutrición al comienzo (Ellington, 1980) o al final de la gestación (Arola y cols., 1982) muestran retraso en el crecimiento. Durante la segunda mitad de la

gestación, el peso fetal se reduce en relación a la duración del ayuno materno (Ariyuki, 1987) y también se encuentra retraso en los fetos de madres subnutridas durante toda la gestación (Snoeck y cols., 1990; Ahokas y cols., 1983).

Uno de los factores que influye en el peso a término del recién nacido es el incremento de peso de la madre durante la gestación. Por un lado, hay autores que han relatado cómo la subnutrición de la madre en la última semana de gestación conlleva a un retardo del crecimiento fetal; la causa sería que la madre se protege a sí misma contra la escasez de nutrientes, disminuyendo el aporte de éstos hacia el feto (Ahokas y col, 1983). Por el contrario, Remesar y col (1988), consideran que en la subnutrición, la madre aumenta el trasvase de nutrientes al conjunto placenta-feto para aminorar la reducción del crecimiento fetal; la consecuencia es que la madre no aumenta de peso en la última semana de la gestación. En nuestros modelos se ha mostrado una atenuación de la ganancia en peso de la rata gestante malnutrida durante los distintos tercios de la gestación (Fig. 6); sin embargo, esta atenuación no consiguió disminuir el retraso del crecimiento fetal en ninguno de los casos considerados. Sí que es de destacar que el peso perdido por las madres fue superior al de sus respectivas crías. Es decir, mientras que el incremento de peso corporal de las madres subnutridas durante el último tercio de la gestación fue un 60% menor que el de sus respectivos controles, sus fetos a término pesaban sólo un 20% menos que las crías de madre control. La pérdida de peso fetal fue todavía menor en los otros dos casos de subnutrición. Ello supone una protección del crecimiento fetal para su supervivencia.

Está estipulado que uno de los factores más importantes que intervienen en el crecimiento fetal es la insulina (Girard, 1989) e incluso se ha descrito una correlación positiva entre la insulinemia fetal y el peso a término (Girard y cols.,

1976). Sin embargo, en los fetos de madres subnutridas, la insulinemia no se encontró disminuida y, es más, en los casos en los que se subnutrió durante el segundo y último tercio de la gestación se encontró incluso aumentada (Fig. 9b). La explicación posible la podemos encontrar en el mecanismo mediante el cual la insulina ejerce sus efectos sobre el crecimiento fetal; se ha descrito que es a través de su interacción con los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs) (Millner y Hill, 1984). De hecho, se ha visto que ratas preñadas, sometidas a restricción proteica, muestran un crecimiento fetal retardado correlacionado con una disminución de IGF-II en los fetos (Rivero y col, 1993; Pilistine y col, 1984). En el mismo sentido, en madres gestantes ayunadas se observa que los fetos presentan un retraso en el crecimiento relacionado con una disminución de la expresión de IGF-I y II (Strauss y col, 1991). Concretamente, en el modelo experimental comenzando la subnutrición el día 16 de gestación se han encontrado niveles disminuidos de IGF-I y II en la etapa fetal (Rivero y col, 1993), lo cual estaría de acuerdo con el menor peso de las fetos a término.

Además, la generación de estos factores de crecimiento en periodo fetal dependen del nivel de anabolismo, el cual a su vez es el producto de un aporte adecuado de nutrientes y del papel preponderante de la insulina en la circulación. Es decir, depende su secreción de un equilibrio insulina/nutrientes. Es claro que en las ratas subnutridas la insulina no está disminuida en ningún caso, por lo que el menor peso corporal encontrado puede ser debido a la disminución de los sustratos disponibles. En este sentido, las madres subnutridas podrían tener una menor concentración de sustratos en plasma, lo que influiría negativamente sobre el crecimiento fetal (Jones, 1990). No obstante, como se observa en las Figs. 7a y 9a, la glucemia de los fetos y madres subnutridas no está alterada por lo que cabría

pensar que serían los aminoácidos en plasma los que estarían disminuidos como consecuencia de la subnutrición o una composición alterada de los nutrientes. Este hecho provocaría una menor disponibilidad de sustratos y, en consecuencia, un retraso en el crecimiento fetal.

El efecto negativo que mostró la subnutrición incidió también en el peso del páncreas fetal, sólo en el caso en que las madres fueron subnutridas en el último tercio de la gestación (Fig. 8b); si bien, el porcentaje de disminución del peso pancreático resultó ser menor que el encontrado para el peso corporal y, en consecuencia, la relación peso del páncreas/peso del cuerpo fue superior en los fetos subnutridos. Se puede pensar que, de alguna forma, se protege al páncreas de la restricción a la que se encuentra sometida. El hecho de que las diferencias sólo se encuentren en el último tercio de la gestación puede deberse a que en los fetos de rata, es durante la última etapa de la gestación, entre los días 20-22, cuando se produce un aumento muy rápido en la masa de células B (Hellerstrom, 1984). En consecuencia, la subnutrición de la madre durante esta etapa va a poder afectar al normal crecimiento y desarrollo de estas células pancreáticas. Sin embargo, como veremos más adelante, este menor peso pancreático no se correspondió con una disminución del crecimiento de los islotes.

El tamaño de la camada sólo se vio ligeramente afectado en el caso de la subnutrición durante la primera semana de gestación. La falta de consecuencias en los otros dos casos es lógica; se piensa que aunque la deficiencia proteica puede aumentar la mortalidad prenatal (sobre todo si se instaura con carácter crónico) su efecto perjudicial se produce entre la ovulación y la implantación; una vez ocurrida ésta ya no hay prácticamente pérdida de fetos (Alexander y cols., 1988).

4.1.4. Efecto de la subnutrición sobre la insulinemia y el contenido de insulina pancreática fetal.

Como se muestra en la Fig. 9b, en la etapa fetal existe una hiperinsulinemia fisiológica que cae tras el nacimiento. Los niveles de hormona plasmática en esta etapa son de tres a cinco veces superiores a los de la madre (Girard y col, 1977; Heggestad y col, 1965) y están correlacionados con un aumento en el contenido de insulina pancreática. Rishi y col (1969) encontraron que este último parámetro aumentó también entre los días 18 y 21 de gestación superando, de igual forma, los niveles de la madre. Ya que la concentración de insulina pancreática es un balance entre la síntesis y secreción de la hormona, se puede pensar que en esta etapa se está produciendo un aumento de ambos procesos y, por tanto, que el máximo desarrollo y crecimiento del páncreas tiene lugar en esta última etapa de la gestación (Swenne, 1992; Portha, 1990).

Tanto la insulinemia como el contenido de insulina pancreática (Fig. 9b y 9c) se encontraron aumentados en los fetos procedentes de madres subnutridas en el último tercio de la gestación. Esto parece indicar que estos fetos serían capaces de una respuesta secretora superior a la de los propios controles. Resultados similares fueron obtenidos por nuestro grupo con la técnica del clamp euglucémico-hiperinsulinémico (Cacho, 1993). Este hecho contrasta con lo encontrado por otros autores (Snoeck, 1990) que reflejaron una alteración en la capacidad insulino-secretora en los fetos de madre subnutrida. Sin embargo, las diferencias podrían ser debidas a que la subnutrición comenzó el día 1 de gestación y no el 14 como en nuestro modelo.

Este posible aumento en la secreción de insulina de los fetos procedentes de madres subnutridas durante el último tercio de la gestación podría ser explicado por

un aumento en la concentración plasmática de distintos sustratos secretagogos.

En la etapa fetal, las células B son capaces de responder a los aminoácidos incluso antes que a la propia glucosa (Heinze y Steinke, 1972); si bien, aunque no se puede descartar de forma definitiva un aumento de aminoácidos en sangre, no parece que éste sea el caso en nuestro modelo de subnutrición.

Por otro lado, la secreción de insulina es sensible a la glucosa desde el día 17 de gestación (Hole y col, 1988). Sin embargo, los niveles de glucosa en sangre, tanto en la madre gestante (Fig. 7a) como en los fetos de 21 días de gestación (Fig. 9a), no difieren de los de sus respectivos controles; con lo cual, el aumento podría explicarse si las células beta de las ratas subnutridas fueran más sensibles a la glucosa.

Por tanto, los resultados obtenidos cuando se subnutre en la última etapa de la gestación parecen indicar que los fetos procedentes de madres subnutridas, lejos de mostrar una disminución de su capacidad insulino-secretora, parecen tenerla aumentada. El comprobar este resultado nos llevó al estudio más en profundidad del efecto de la subnutrición sobre la funcionalidad de las células B tanto de madres como de fetos de 21 días de gestación.

4.2. SECRECION DE INSULINA EN RATAS MADRES SUBNUTRIDAS EN EL ULTIMO TERCIO DE LA GESTACION Y EN SUS FETOS.

4.2.1. Secreción de insulina *in vivo* en madres subnutridas de 21 días de gestación.

La prueba de tolerancia a la glucosa es un método experimental *in vivo* que nos permite obtener información sobre la acción insulínica en el metabolismo global de la glucosa. Aunque existen otras técnicas más sofisticadas (Del Prato y cols., 1984), este método se sigue utilizando ampliamente en la actualidad. Como ya se comentó, consiste en administrar una sobrecarga de glucosa y efectuar un seguimiento de los cambios en la glucemia e insulinemia que tienen lugar en el momento posterior a la administración. La administración de la glucosa se hizo por vía intravenosa; algunos autores han señalado la existencia de distintas capacidades en la absorción intestinal de esta hexosa en función de la concentración proteica de la dieta (Weinkowe y cols., 1977), lo que provocaría un enmascaramiento de la tolerancia. Si la hiperglucemia inducida se prolonga más de lo considerado normal, se dice que existe una "intolerancia a la glucosa".

En las ratas gestantes, la prueba se llevó a cabo a lo largo de dos horas, tomando muestras a los 10, 15, 20, 30, 60 y 120 minutos de la administración de la glucosa. Como se puede observar en la Fig. 11, los valores de glucemia en las ratas subnutridas fueron superiores a los de las madres controles durante todo el periodo de duración de la prueba, hecho que aparece reflejado en una mayor respuesta integrada para la glucosa en este grupo experimental. Esto indica que la subnutrición en la última etapa de la gestación provocó una intolerancia a la glucosa en el día 21 de gestación. En las ratas controles la respuesta fue normal aunque se han descrito casos en los que se produce en la gestación una tolerancia ligeramente

dañada a costa de un mayor aumento en la secreción de insulina (Martin y cols., 1986) que compensaría la resistencia periférica a la acción insulínica.

El análisis de la secreción de insulina (Fig. 12) puso de manifiesto que la sobrecarga de glucosa no indujo en las madres subnutridas una adecuada respuesta insulino-secretora; aunque los islotes de las madres subnutridas secretaron insulina en el mismo sentido que las controles, el valor de este parámetro se encontró disminuido con respecto a lo encontrado en el grupo control. Este resultado es comparable al obtenido por otros autores en ratas adultas subnutridas (Okitolonda y cols., 1988; Swenne y cols., 1988; Younoszai y Dixit, 1980; Weinkowe y cols., 1977). Es decir, la subnutrición durante la última semana de la gestación provoca en la madre una intolerancia a la glucosa acompañada de una disminución de la secreción de insulina en respuesta a este secretagogo.

La intolerancia a la glucosa puede ser debida a la propia disminución de la liberación de insulina (Milner, 1971; Becker y cols., 1971), a una mayor resistencia insulínica (Bowie, 1964) o a la combinación de ambas situaciones (Becker y cols., 1972).

Recordemos, que en la rata normal gestante, la respuesta insulínica en los tejidos periféricos está disminuida (Martin y cols., 1986) y parece que las ratas subnutridas podrían tener todavía una mayor resistencia insulínica, los resultados obtenidos no nos permiten afirmarlo; lo que sí queda patente es una alteración funcional de las células B provocando una pérdida de la secreción de insulina que va a contribuir a la intolerancia encontrada (Levine y cols., 1983).

Como ya hemos comentado, durante la gestación se produce un aumento en la demanda de insulina; para acomodarse a esta situación es esencial que los islotes de Langerhans sufran adaptaciones funcionales y estructurales adecuadas a esta

nueva situación. Si los islotes de la madre no son capaces de responder a esta demanda se puede provocar una intolerancia a la glucosa y el posible desarrollo de una diabetes gestacional perjudicial tanto para la madre como para el feto (Jovanovic-Peterson, 1991). Estos cambios en el páncreas endocrino van a implicar un aumento en la síntesis (Bone y Taylor, 1976) y secreción de la hormona (Sorenson y Parson, 1985). A su vez, esta hipersecreción se va a deber en parte al aumento en la proliferación de células B y del volumen de los islotes que tiene lugar al final de la gestación (Van Assche, 1974). Todos los cambios conocidos y característicos de la gestación se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que son inducidos por las hormonas placentarias (lactógeno placentario y estrógenos) (Sorenson y Parson, 1985; Brelje y Sorenson, 1991). Podemos pensar, que de alguna forma, la subnutrición está afectando estos cambios necesarios que tienen lugar en el páncreas endocrino en su proceso de adaptación a la gestación, alterando la propia funcionalidad de las células B y/o modificando los niveles de los factores implicados en esta adaptación. Todo ello será discutido ampliamente a continuación.

4.2.2. Secreción de insulina *in vitro* en madres de 21 días de gestación subnutridas.

La mala respuesta secretora encontrada *in vivo* no nos permite diferenciar si el defecto se debe a un fallo propio del mecanismo secretor de la célula B o si se encontraban implicados factores inhibidores de la secreción *in vivo*. Para ello decidimos estudiar la respuesta de los islotes aislados de las madres gestantes en un sistema *in vitro* en el que nosotros incluimos los secretagogos que queríamos evaluar. Este método nos permite valorar la respuesta de las células B sin interferencias de factores que pueden encontrarse en el animal *in vivo* (Malaisse-

Lagae y Malaisse, 1984).

Los islotes fueron incubados con glucosa en distinta concentración (2.8mM y 16.7mM), con glucosa y arginina (2.8mM glucosa + arginina y 16.7mM glucosa + arginina) y con leucina. Como se puede observar en la Fig 13b, la respuesta que se obtuvo en todas las condiciones no difirió entre ambos grupos. No obstante, el contenido de insulina de los islotes de las madres subnutridas fue inferior al encontrado en las madres controles (Fig. 13a). Este hecho contrasta con lo encontrado en la bibliografía: en la mayoría de los casos la respuesta *in vitro* de los animales sometidos a subnutrición se encontró disminuida (Swenne y cols., 1982; Levine y cols., 1983; Younoszai y Dixit, 1980). Las diferencias se pueden deber a que en estos modelos la subnutrición se realizó en etapa adulta y no durante la gestación. El tiempo, además, en todos los casos fue superior a la semana de restricción de estas madres subnutridas.

Por tanto, a la vista de los resultados, se puede concluir que no parece existir un defecto en los mecanismos secretores de las células B de los animales subnutridos. Los resultados indican que en ambos grupos, control y subnutrido, hay un aumento en la actividad de las células B en respuesta a glucosa y aminoácidos comparado con los islotes de ratas adultas no gestantes (Fig. 20b). Este aumento se puede deber a una mayor eficiencia de los mecanismos secretores y a un aumento de la sensibilidad a la glucosa de las células B, hecho que se ha sugerido que ocurre en la gestación (Bailey y Sorour, 1980). Sin embargo, la disminución de insulina *in vivo* ha sido puesta de manifiesto. Se podría pensar que aunque los islotes son capaces de tener una respuesta normal a la glucosa, el número de ellos en el páncreas de los animales subnutridos está disminuido. Más aún, que la subnutrición de alguna forma impide que se produzcan los cambios necesarios que tienen lugar

durante la gestación (hiperplasia, hipersecreción) y no se de el adecuado aumento en respuesta a la mayor demanda insulínica. Ya comentamos que estos efectos en parte son mediados por las hormonas placentarias (Moldrup y cols., 1993) que se ha visto que estimulan la función de las células B tanto in vivo como in vitro (Nielsen y cols., 1992). En islotes cultivados la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (PRL) y el lactógeno placentario (PL) estimulan la producción de insulina y la síntesis de DNA (Nielsen, 1982). Además, aunque el IGF-1 media parte de las respuestas de la GH en otros tejidos (Green y cols., 1985), los efectos de la GH, PRL y PL sobre las células B son directos (Billestrup y Nielsen, 1991). Estos aumentos están, además, acompañados de un incremento en el páncreas de las ratas gestantes de la expresión de los receptores de GH y PRL (Moldrup y cols., 1993). Aparte del lactógeno placentario, los estrógenos también se encuentran aumentados al final de la gestación (Parson y cols., 1992) y el resultado de varios experimentos es que los estrógenos y la progesterona aumentan la secreción de insulina (Costrini y Kalkhoff, 1971) y la progesterona inhibe la replicación de las células B (Green y cols., 1978). Con todo ello, Sorenson y cols. (1993), sugieren que existe una compleja interacción entre los esteroides gestacionales y el lactógeno placentario de forma que los esteroides pueden estimular, facilitar o inhibir la función de las células B dependiendo de la duración de la exposición de los islotes a las hormonas lactogénicas. Más aún, un mal balance de hormonas esteroideas y lactogénicas tanto en su concentración y/o en su duración de exposición a los islotes, puede conducir a alteraciones en su función como ocurre en la diabetes gestacional. Esto podría suceder en las ratas subnutridas puesto que está ampliamente descrito el efecto negativo de la subnutrición provocando un gran número de alteraciones hormonales (Becker, 1983). Recientemente, Brelje y cols., (1994) han propuesto que la causa

del bloqueo del aumento de la función de los islotes observado por Green y Taylor (1972) en madres sometidas a restricción dietaria durante la gestación podría deberse a factores adicionales que contraresten el efecto del aumento de la actividad lactogénica sobre la proliferación de las células B; explicación que podría aplicarse al modelo de subnutrición propuesto.

Aunque el incremento en la masa de células B puede contribuir a aumentar la secreción de insulina durante la gestación, es sabido que el aumento en el potencial de secreción es más importante. Este potencial se manifiesta por una disminución del umbral de estimulación de glucosa y un aumento del umbral de secreción de insulina. Los islotes de las madres subnutridas no presentan anomalía en su mecanismo secretor, por lo que, aparte de una disminución de la masa de células B, hemos de tener en cuenta la existencia de factores extrapancreáticos implicados en la modulación de la secreción de insulina *in vivo* (Flatt y cols., 1991). Así Younoszai y Dixit (1980) encontraron en ratas subnutridas un aumento de la concentración pancreática de somatostatina, hormona capaz de inhibir la secreción de insulina. De especial interés sería el control del sistema nervioso central (SNC), cuya influencia, obviamente, está ausente *in vitro*. Atef y cols., (1992) han implicado al SNC no sólo en el control de la secreción de insulina, sino también en el del flujo de sangre que llega a los islotes.

4.2.3. Secreción de insulina *in vitro* en fetos de 21 días de gestación procedentes de madres subnutridas.

Como ya hemos comentado, la malnutrición de la madre durante la última semana de la gestación provocó en sus fetos una disminución del peso del páncreas y un aumento en la insulinemia y el contenido de insulina pancreática. Aunque es

evidente el efecto de la subnutrición materna sobre el desarrollo y funcionalidad del páncreas fetal, es un tema que ha sido poco estudiado en la literatura.

El aumento de la insulinemia y del contenido de insulina pancreático fetal parecían apuntar a una mayor capacidad de los islotes fetales para secretar insulina *in vivo*. Esto nos llevó al estudio de la respuesta insulino-secretora *in vitro*, utilizando islotes aislados de los fetos subnutridos y controles.

Se sabe por estudios previos que los islotes de fetos de madres control no muestran (Heinze y Randle, 1972) o muestran poca (Mourmeaux y cols., 1985) liberación de insulina en respuesta a altas concentraciones de glucosa en comparación con los islotes adultos normales. En nuestro experimento, después de 5-7 días de cultivo, los fetos controles no liberaron prácticamente insulina en presencia de glucosa, ni ésta aumento cuando se pasó de una concentración basal de glucosa (2.8mM) a una estimulante (16.7mM). No obstante, la secreción si aumentó cuando se añadió al medio de incubación arginina o leucina (Fig. 14b). Un gran número de estudios *in vitro* han mostrado que la glucosa no es efectiva en promover la liberación de insulina en páncreas fetales de ratas y humanos (Portha, 1990). En el día 16 de gestación, cuando no hay respuesta para la glucosa, si que se observa respuesta a la arginina y leucina. Esto indica que el fallo en la secreción no está en los mecanismos de exocitosis sino en la secuencia estímulo-secreción de la glucosa. A pesar de tener reservas adecuadas de insulina, una buena capacidad de biosíntesis de la hormona, un buen funcionamiento para los aminoácidos y una maquinaria normal la respuesta es inmadura para la glucosa (Portha, 1990). La causa puede estar en la pérdida de una señal, un canal o un sensor. Se ha propuesto que la glucosa no tiene habilidad para despolarizar la membrana y que los canales de potasio no responden a la glucosa (Portha, 1990).

Como era de esperar por los resultados obtenidos en los fetos subnutridos, éstos mostraron un mayor contenido de insulina por islote (Fig. 14a) y una mayor respuesta secretora en todos los casos considerados. Además, las mayores diferencias se encontraron en los casos en los que existía glucosa en el medio de incubación. Parece ser que los fetos de madre subnutrida presentan una mayor maduración de la respuesta a la glucosa. Resultados similares fueron obtenidos por Bihoreau y cols. (1986) en fetos de madres que fueron hechas ligeramente hiperglucémicas usando una continua infusión de glucosa durante la última semana de la gestación. Estos fetos mostraban un aumento de la concentración de insulina en plasma y páncreas y aumento de la respuesta a glucosa *in vitro*. Es decir, un periodo corto de exposición a hiperglucemia puede claramente afectar la función de las células B fetales. En el mismo sentido una diabetes gestacional ligera en la madre produce modificaciones estructurales y funcionales en el páncreas fetal tales como aumento del tejido endocrino, aumento del porcentaje de células B (Erikson y Swenne, 1993) y alto contenido insulínico (Aerts y Van Assche, 1977).

La maduración de la respuesta secretora de los islotes está influenciada por muchos factores, incluyendo metabolitos energéticos, neurotransmisores y hormonas (Epple y Brinn, 1987). Ya hemos comentado como las hormonas placentarias desempeñan un importante papel en la maduración de la sensibilidad a la glucosa al influenciar tanto mecanismos de síntesis como de secreción de insulina (Billestrop y Nielsen, 1991). Boscher y cols. (1993) han mostrado que la prolactina *in vitro* incrementó la sensibilidad a la glucosa de islotes fetales cultivados, a pesar de que la influencia de dicha hormona en fetos está poco clara.

No obstante, la principal observación de este estudio son los rasgos que presentaron los fetos subnutridos, propios de hijos de madres con diabetes

gestacional (Pedersen, 1977). Probablemente, aunque las madres subnutridas son normoglucémicas, la intolerancia a la glucosa que presentan podría provocar episodios de hiperglucemia más sostenida en la madre en los momentos posteriores a la ingestión de alimentos. Estos episodios podrían ser suficientes para aumentar la concentración de glucosa disponible y transferirla al feto; éste estimularía así sus células B. Resultados similares han sido obtenidos por Erikson y Swenne (1993) que demostraron que ratas previamente malnutridas, con una capacidad de producción de insulina disminuida, no podían mantener una tolerancia normal a la glucosa durante la gestación. Aunque el daño parecía ligero en las madres, fue suficiente para afectar en el mismo sentido a sus fetos que lo encontrado en este estudio.

Dahri y cols. (1991), sin embargo, encontraron que subnutrir durante toda la gestación provocaba una disminución de la funcionalidad del páncreas fetal acompañado de alteraciones estructurales. La diferencia la podemos encontrar en la duración de la subnutrición durante toda la gestación. Al igual que una diabetes gestacional severa provoca graves alteraciones de la homeostasis glucídica materna y, en consecuencia, un pobre desarrollo del páncreas (Erikson y Swenne, 1982) y una diabetes gestacional ligera con media alteración de la tolerancia a la glucosa provoca un aumento del desarrollo de las células B fetales (Erikson y Swenne), la mayor o menor duración de la subnutrición puede provocar mayores o menores alteraciones del metabolismo glucídico y repercutir así de forma distinta en la estructura y funcionalidad del páncreas.

4.2.4. Efecto de la subnutrición sobre el desarrollo y morfología de las células B de fetos de 21 días de gestación subnutridos.

El estudio histológico del páncreas de los fetos subnutridos apoyó los

resultados obtenidos en cuanto a su funcionalidad *in vitro* e *in vivo*. Según se mostró en la Tabla 4, el porcentaje de células B de los fetos subnutridos, al igual que su masa, se encontró aumentada en más de un 40% con respecto a lo encontrado en los fetos control. Resultados similares son obtenidos por Erikson y Swenne (1993). Así pues, tanto la estructura como la función del páncreas se ven afectados por la subnutrición materna durante la última semana de la gestación.

La modulación del incremento de células B está regulado por mecanismos que afectan a dos tipos celulares: a) una población precursora y b) las propias células B.

a) En la rata, la masa de células B se duplica durante los últimos días de la gestación y ese proceso expansivo depende en un 80% de la proliferación y diferenciación de células precursoras pluripotenciales (Portha, 1990).

b) Existe una fracción de células B susceptibles de ingresar en un ciclo de división, fracción denominada "compartimento proliferativo". Se ha demostrado *in vitro* que la glucosa induce un incremento del tamaño de este compartimento; es decir, bajo su influencia aumenta el número de células B destinadas a multiplicarse (Swenne, 1992). El aumento del tamaño no es muy notable (son pocas las células que responden así a la glucosa), pero la rapidez del ciclo celular conduce, finalmente, a un agrandamiento considerable de la masa del islote (Hellerstrom, 1984). Todo ello es la causa básica de la hiperinsulinemia fisiológica fetal característica del final de la gestación.

Si aceptamos que las madres subnutridas pueden sufrir episodios de hiperglucemia, ésta puede ser transmitida al feto, aumentar el proceso expansivo insular y explicar así el aumento de la masa de células B de los fetos. En este sentido, experimentos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* en roedores con diabetes gestacional ligera han mostrado claramente una marcada hipertrofia de los islotes

pancreáticos fetales (Reusens-Billen y cols., 1984), que podría estar iniciada por la hiperglucemia materna.

4.3. REPERCUSIONES DE LA SUBNUTRICION COMENZADA EN EL ULTIMO TERCIO DE LA GESTACION Y CONTINUADA HASTA LA EDAD ADULTA SOBRE LA SECRECION DE INSULINA. ESTUDIO EN FETO, NEONATOS DE 4, 14 Y 23 DIAS Y EN ADULTO DE 70 DIAS DE VIDA.

4.3.1. Efecto de la subnutrición sobre el peso del cuerpo y del páncreas.

El establecimiento, en el estudio anteriormente expuesto, de que la subnutrición, en el último tercio de la gestación, provoca un mayor retardo que en estadios anteriores nos hizo proceder al estudio de las consecuencias de la subnutrición en dicha etapa. Para ello sacrificamos a los animales en distintos estadios: fetos de 21 días, etapa lactante (4, 14 y 23) así como en el periodo adulto. Se observó cómo la disminución de la ingesta provocó un retraso del crecimiento y, en consecuencia, un menor tamaño de los animales en todas las etapas consideradas (Fig. 16).

Como ya comentamos, la subnutrición se instauró de forma indirecta, sobre la madre gestante, en un momento temprano del desarrollo (14 días de gestación), por lo que los efectos de la restricción sobre el crecimiento se hicieron notar ya en los fetos a término. Pero, la dieta materna no es sólo esencial para la embriogénesis, crecimiento y desarrollo fetal sino que también es de gran importancia durante la lactación (Koski y col, 1990). La lactancia supone un aporte de recursos nutritivos mayor que los que se podrían dar durante la gestación, ya que las crías son de mayor tamaño que los fetos, tienen vida independiente y altas tasas de crecimiento (Remesar y col, 1988). En el metabolismo materno tiene lugar una serie de cambios que capacitan a la glándula mamaria para aportar los nutrientes y energías necesarias para las ratas lactantes. Por ello, la lactación está acompañada por una marcada hiperfagia de la madre (Sampson y Jansen, 1984).

En esta etapa, nuestras madres restringidas ingieren sólo un 30-40% de lo que ingieren las ratas controles. Este hecho origina un daño sobre el peso de las ratas lactantes. Por tanto, las ratas subnutridas que ya presentaron un peso inferior en la etapa fetal, durante la lactancia acentuaron el retraso de crecimiento. La disminución de la disponibilidad de nutrientes en la madre va a producir modificaciones en la composición y producción de la leche. En cuanto a la composición, no se van a encontrar demasiados cambios cuantitativos, aunque algunos componentes varíen como consecuencia del déficit materno (Jelliffe, 1978; Crnic y Chase, 1978). Por su parte, la producción de leche puede verse afectada lo que implica una menor cantidad de leche disponible para las crías (Grigor y col, 1987; Sampson y Jansen, 1984).

Además, no hay que olvidar que tanto durante la lactancia como ya en la etapa adulta, los animales subnutridos presentan cambios en la concentración plasmática de varias hormonas (insulina, GH, TSH) (Aláez, 1992; Rodríguez, 1990), lo que puede influir, de igual modo, en el crecimiento y desarrollo antes y después del destete (Girard, 1989). Aunque en la etapa adulta los requerimientos de proteínas de la dieta son esencialmente para el mantenimiento del organismo (y, por tanto, son menores que los requeridos en las etapas fetal y lactante), una deficiencia en este periodo origina, también, retrasos importantes en la restitución de tejidos (Buchanan, 1984). Evidentemente, el efecto negativo que sobre el crecimiento tiene la malnutrición no incide sólo en el peso corporal sino también en el peso de diferentes órganos. Dixit y Sorenson (1987) y Younoszay y Dixit (1980) habían mostrado una reducción del peso pancreático en modelos de restricción alimentaria. De igual forma, en nuestras ratas subnutridas, se encontró el peso del páncreas disminuido, con respecto a los animales control, en todas las etapas estudiadas (Fig. 17). No

obstante, el porcentaje de disminución del peso pancreático resultó ser menor que el encontrado para el peso corporal y, en consecuencia, la relación peso del páncreas/peso del cuerpo fue superior en las ratas subnutridas (Tabla 5). Esta relación se ha observado igualmente aumentada en el caso del peso cerebral (Rodríguez, 1990) y ha sido interpretada como una adaptación especial que protege al cerebro de los efectos perturbadores de la subnutrición (Yeh y col, 1982). En el mismo sentido que se comentó en la etapa fetal, se puede pensar que nuestras ratas subnutridas, de alguna forma, protegen al páncreas de la restricción a la que se encuentran sometidas.

Sin embargo, a pesar de esta posible protección, numerosos trabajos ponen de manifiesto la existencia de alteraciones funcionales y estructurales del páncreas en la subnutrición (Dahri y col, 1991; Dixit y Kaung, 1985; Gabr, 1981; Weinkowe y col, 1977). El efecto sobre la funcionalidad (capacidad insulino-secretora) de las células B será discutido posteriormente, pero se puede adelantar que varios autores achacan parte de estas deficiencias a las modificaciones morfológicas e histológicas que tienen lugar en la subnutrición: reducción de la masa de células de los islotes y del tamaño y número de células B (Rao, 1988) así como menor proporción de tejido endocrino frente al exocrino (Dahri y col, 1991).

Aunque la capacidad proliferativa de las células B disminuye con la edad, la masa de éstas continua incrementandose durante las etapas lactante y adulta (hasta el día 210 de vida) (Portha, 1990). Sin embargo, recientemente Swenne y col (1992) han encontrado que la subnutrición proteico-energética temporal en ratas jóvenes provoca una reducción de la masa de células B al disminuir la capacidad de crecer y replicarse de éstas y que esta reducción no es compensada aunque se produzca una rehabilitación nutricional; por tanto, la subnutrición parece provocar un déficit

irreversible en el número de células B.

4.3.2. Evolución de la funcionalidad del páncreas en las ratas subnutridas.

La subnutrición afecta tanto al crecimiento y desarrollo del páncreas como a su funcionalidad (síntesis y secreción de insulina). En este sentido, numerosos autores han mostrado que la restricción nutricional provoca una disminución de los niveles de insulina plasmáticos debido a la menor capacidad de secreción de la hormona (Claeysens y col, 1992; Okitolonda y col, 1988; Crowe y Royle, 1988; Alvarez y col, 1986; Becker, 1983; Rao, 1982; Robinson y Picou, 1977).

Como ya se vió en la sección 4.1.4., los fetos subnutridos mostraron una insulinemia superior que la de sus respectivos controles. A partir del nacimiento, durante la lactancia, los niveles de insulina se mantienen bajos con respecto a controles y van acompañados de un aumento muy marcado en la concentración de insulina pancreática. Es de destacar el día 4 de vida en el que el aumento de este parámetro alcanza su máximo, siendo su valor unas 15 veces superior al encontrado en la etapa fetal, para las ratas controles y 8 veces, para las subnutridas (Fig. 19). Este aumento ha sido interpretado como una respuesta a la nueva demanda alimenticia del páncreas (Rishi y col, 1969). En esta etapa, la dieta es rica en grasas y pobre en carbohidratos por lo que se requiere una menor cantidad de insulina y, en consecuencia, una menor secreción de la hormona; sin embargo, la síntesis podría no estar disminuida y provocar así un mayor acúmulo pancreático de insulina.

Al contrario de lo que ocurrió en la etapa fetal, a partir del nacimiento y hasta la edad adulta, la subnutrición provocó una disminución de la insulinemia (Fig. 18b) así como una concentración pancreática de insulina normal (Fig. 19). Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos de nuestro grupo que mostraron un

deficit en la capacidad de respuesta secretora en las ratas lactantes subnutridas (Escrivá y col, 1990). Estos hechos hacen pensar que si bien los animales subnutridos tienen afectada la secreción de insulina, aparentemente, no parece existir ninguna alteración en la síntesis de la hormona. Resultados similares han sido encontrados por otros autores (Younoszay y Dixit, 1980; Dixit y Sorenson, 1987) aunque también se han descrito alteraciones en la secreción de insulina acompañadas bien de un aumento de la hormona en páncreas (Weinkowe, 1976) bien de una disminución (Dollet y col, 1987; Khardory y col, 1980).

Se puede concluir, por tanto, que la insulinopenia que reflejan nuestras ratas subnutridas a partir del nacimiento no parece ser debida a una menor concentración de la hormona en el páncreas sino, más bien, a un defecto en la secreción. Además, esta alteración en la respuesta secretora no aparece en la etapa fetal por lo que debe establecerse con posterioridad al nacimiento.

4.3.3. Secreción de insulina *in vitro* en ratas subnutridas desde la etapa fetal hasta los 70 días de vida.

Según acabamos de ver, nuestras ratas subnutridas mostraron desde el nacimiento una disminución de la concentración de insulina en plasma que ha sido interpretada como una consecuencia del descenso en la capacidad de respuesta pancreática. Esta disminución de la secreción de insulina *in vivo* fue puesta ya de manifiesto en nuestro grupo (Escrivá y cols., 1990) con las pruebas de tolerancia a la glucosa en las ratas subnutridas de 70 días de vida. Estos estudios mostraron una tolerancia a la glucosa normal en las ratas subnutridas frente a una disminución muy marcada de la secreción de insulina; esto indica que existe una adaptación a la baja insulina circulante compensándose con un aumento en la capacidad de respuesta en

los tejidos periféricos a la hormona (Escrivá y cols., 1992). Es decir, una hipersensibilidad a la insulina en tejidos diana.

En cualquier caso, a pesar de esta adaptación queda patente la disminución de la capacidad insulino-secretora en la subnutrición, resultados que están de acuerdo con lo encontrado en la bibliografía en otros modelos experimentales (Crowe y cols., 1988; Okitolonda y cols., 1987; Swenne y cols., 1987). Para intentar comprender la naturaleza de esta alteración funcional realizamos un estudio de la secreción de insulina *in vitro*. Para ello aislamos islotes de Langerhans de las ratas controles y subnutridas de 70 días de vida y los incubamos con distintas concentraciones de glucosa, también con glucosa más arginina así como con leucina. Como se observa en la Fig. 20a, el contenido de insulina de los islotes se encontró disminuido en las ratas subnutridas comparadas con las ratas control. En la Fig. 20b se puede ver como la respuesta secretora se encontró disminuida en todas las condiciones consideradas en las ratas subnutridas frente a las ratas control. Resultados similares se han encontrado en la literatura en modelos de subnutrición en la etapa adulta (Weinkowe y cols., 1976; Levine y cols., 1983; Swenne y cols., 1987) y más recientemente Rasschaert y cols. (1995) han mostrado los mismos resultados con un modelo de subnutrición proteica comenzado desde la etapa fetal. Aunque la subnutrición cualitativamente fue distinta ya que sólo fue proteica y el comienzo también fue anterior a la última semana de gestación, el resultado al que llegaron es exactamente comparable al mostrado en este trabajo. Se puede concluir pues que el defecto insulino-secretor encontrado *in vivo* tiene un reflejo *in vitro* y que los propios mecanismos secretores se encuentran afectados en la subnutrición. Los resultados muestran que la respuesta se encuentra afectada tanto para la glucosa como para la leucina y no parece estar disminuido en el caso de la arginina, ya que el tanto por

ciento de aumento en la secreción que experimentan en presencia del aminoácido es similar en ambas poblaciones, control y subnutrida.

Recordemos que el efecto de la glucosa sobre la liberación de insulina está ligado a la capacidad de las células B para transportar y metabolizar el azúcar (Malaisse, 1992). El fallo en la secreción puede pasar por tanto por alguna anomalía en estos dos procesos: transporte y metabolismo de la glucosa.

El efecto de la subnutrición sobre el transportador de glucosa GLUT-2 será discutido más adelante. En cuanto al metabolismo de la glucosa, ya se comentó en la introducción las enzimas que podían desempeñar un papel modulador de la secreción de insulina. Cuando la glucosa entra en la glucólisis comienza a ser fosforilada por la glucokinasa, una enzima cuyas características le permiten adaptar la velocidad de degradación de la glucosa a la concentración ambiental de esta molécula. Aunque no se han descrito modelos animales en los que una deficiencia de glucokinasa pueda representar el principal factor de la disfunción de las células B (Malaisse, 1993), la posibilidad de que una disminución en la actividad de esta enzima pueda impedir la respuesta insulino-secretora de la glucosa debe ser contemplada. De hecho, se ha descrito que en el ayuno se induce una adaptación de las enzimas glucolíticas claves en la liberación de insulina (Malaisse y cols., 1976).

El transporte y la fosforilación de la glucosa son los primeros pasos del uso del azúcar en la célula B. Los pasos siguientes, glucólisis y oxidación, son críticos en la secreción de insulina inducida por glucosa. La glucólisis ocurre en el citosol y la oxidación ocurre en la mitocondria. Se ha presumido durante mucho tiempo que la ligazón entre los dos eventos en términos de secreción de insulina es el piruvato. No obstante, el piruvato no tiene actividad insulino-secretora por si mismo y recientemente se ha sugerido la existencia de otras uniones entre la glucólisis y la

mitocondria (Portha y cols., 1994). Se cree que esta unión puede ser la ruta del glicerol fosfato (Rasschaert y Malaisse. 1991). Esta ruta moviliza protones desde el citosol a la mitocondria, donde entran a la cadena respiratoria para generar ATP. El incremento en la circulación de la ruta del glicerol fosfato causado por un aumento de la concentración de glucosa puede ser debido, al menos en parte, por la activación por el calcio de la glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGDH) (Sener y Malaisse, 1992). Esta enzima se considera la enzima clave de la ruta del glicerol fosfato. Un impedimento de la actividad de la mGDH podría conducir a una alteración de la liberación de insulina. En este sentido, se ha descrito una disminución de la actividad de la mGDH en islotes de ratas adultas que fueron inyectadas con estreptozotocina durante el periodo neonatal (Giroix y cols., 1991) y se ha propuesto que en numerosos modelos de diabetes tipo 2 una disminución de esta actividad, puede provocar, al menos en parte, un impedimento de la respuesta secretora de los islotes a la glucosa (Malaisse, 1993). Resultados similares fueron obtenidos con modelos animales sometidos a subnutrición proteica (Sener y cols., 1993; Dahri y cols., 1994). Rasschaert y cols. (1995), más recientemente, ha mostrado una disminución de la mGDH mitocondrial en islotes de rata sometida a subnutrición proteica desde la etapa fetal hasta la edad adulta; hecho que podría participar en la disminución de la respuesta insulino-secretora a la glucosa observada *in vivo* e *in vitro*. No obstante, al igual que en nuestro modelo, ellos encontraron también disminuida la respuesta a una mezcla de leucina y glutamina. Se puede pensar, que en el efecto disminuido a los aminoácidos podría estar implicada de igual forma una alteración en las enzimas que participan en el catabolismo de los aminoácidos en las células de los islotes. Recordemos que el efecto de la leucina provocando la secreción de insulina está ligado a su metabolismo en la célula B,

mientras que la arginina, cuyo efecto no pareció estar alterado, estimula la secreción despolarizando la membrana de las células B en su transporte al interior celular.

En resumen, se puede pensar, que existe una perturbación multifactorial provocada por la falta de nutrientes en las células de los islotes de las ratas subnutridas que podría dar como resultado la disminución del contenido insulínico de los islotes y de la respuesta insulino-secretora a la glucosa y los aminoácidos. La investigación de estos factores queda abierta a investigaciones futuras aunque al final de este trabajo se exponen resultados preliminares sobre la posible alteración de los transportadores de glucosa.

4.3.4. Efecto de la subnutrición sobre la masa de células B de ratas subnutridas de 4 y 70 días de vida.

El incremento con la edad de la masa total de células B en las ratas controles confirma las investigaciones previas del crecimiento de las células B (Portha, 1990; Mc Evoy, 1981). Se ha dicho que la expansión de la masa de células B en la rata postnatal se debe a un aumento del número de células (hiperplasia) y a un aumento del tamaño de estas (hipertrofia) (Swenne y cols, 1992); aunque nuestros resultados no nos permiten establecer la importancia de cada uno de estos factores podemos suponer que uno y otro están implicados. Además, la replicación, crecimiento y desarrollo de las células B de las ratas control muestra que el islote tiene una gran plasticidad y se adapta a variaciones en la demanda funcional durante el desarrollo (Hellerström, 1977).

Es de destacar el aumento experimentado en el porcentaje y masa de células B el día 4 de vida (Tabla 7). Varios autores han mostrado que, ratas neonatales hechas diabéticas el día de nacimiento recuperan su función normal en la primera

semana de vida (Portha y cols., 1974; Canteys y cols, 1981). Este espontáneo proceso de recuperación se caracterizó por la reaparición de células B (Bonner-Weir y cols., 1981). Diversos estudios (Cantenys y cols., 1981) indican que este aumento en la formación de nuevos islotes que tiene lugar alrededor del día 4 de vida se debe a la multiplicación y diferenciación de células precursoras no diferenciadas del epitelio ductal. Breant y cols. (1992) han revelado en el interior de ciertas células endocrinas, presentes tres días después de la inducción de una diabetes, la existencia de dos tipos de gránulos, de insulina y glucagón. Estas células llamadas PEPS (Polymorphic Endocrine Pancreatic cell subtype) están consideradas como los intermediarios endocrinos pluripotenciales que participan en la regeneración de células B (Breant y cols., 1992). Por tanto, este aumento encontrado en la masa de células B es debido a la neoformación de células B y se corresponde con el aumento encontrado en el contenido de insulina pancreática en el mismo día de vida.

Como se muestra en la Tabla 7, las ratas subnutridas de 4 días de vida presentaron un porcentaje y masa de células B (medida por planimetría electrónica con la ayuda de un sistema de análisis de imagen BIOCOM) inferior que el de los controles de la misma edad. Mientras que las ratas controles aumentaron en un 80% su masa desde la etapa fetal, las subnutridas que partían de una masa mayor sólo aumentaron en un 30%. Estos resultados indican que la subnutrición de los neonatos inhibe en cierta medida la regeneración espontánea de células B que tiene lugar el día 4 de vida.

Los factores que afectan la proliferación de las células endoteliales son complejos y han sido poco estudiados. Se ha dicho que la insulina es un factor de crecimiento para las células endoteliales (Bar, 1982) y las ratas subnutridas de 4 días de vida muestran una disminución de esta hormona en sangre con respecto a las ratas

control. Otros factores que han sido implicados en la regeneración y proliferación de células endoteliales son los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) (Bar y cols., 1986) y éstos se han encontrado disminuidos en la subnutrición (Rivero y cols., 1993; Prewitt y cols., 1982; Rivero, 1994).

Por tanto, la subnutrición va a poder crear un mal balance de los factores de crecimiento implicados en la proliferación y maduración de las células B (GH, IGFs, EGF, PDGF, insulina), lo que va a llevar al menor aumento de la masa y porcentaje de células B encontrado en las ratas subnutridas de 4 días de vida.

A los 70 días de vida, el porcentaje de células B de ambas poblaciones, control y subnutrida, fue similar (Tabla 7) y los cortes histológicos fueron indistinguibles (Fig. 22). No obstante, debido al menor tamaño del páncreas de las ratas subnutridas, la masa de células B se encontró significativamente disminuida en la subnutrición. Swenne y cols. (1992) encontraron también una reducción de la masa de células B, en la edad adulta, después de un periodo de subnutrición proteico-energética; disminución que continuó incluso después de la rehabilitación nutricional de los animales.

Se ha sugerido que la subnutrición proteico-energética inhibe la replicación y produce atrofia de las células B (Swenne y cols, 1992), aunque también se ha encontrado hipertrofia o no cambios (Wachstein y Meisel, 1954). La atrofia de las células B parece ser un rasgo típico de la deficiencia proteica mientras que si la restricción es sólo calórica se ha descrito que no hay disminución en la relación masa de células B/peso corporal (Ashworth y cols., 1952).

A la vista de los resultados, podemos decir que la subnutrición tiene un efecto directo sobre la célula B disminuyendo su capacidad de regeneración y proliferación (a los 4 días de vida) y su capacidad de crecimiento y replicación (a

los 70 días de vida). Las alteraciones morfológicas e histológicas que tienen lugar en la subnutrición: reducción de la masa total de células B, pueden ser en parte responsables de las alteraciones funcionales encontradas. Sin embargo, estas modificaciones no son del todo suficientes para explicar la severidad en la disminución de la respuesta insulino-secretora.

4.4. ESTUDIO, EN PERIODO ADULTO, DE LAS CONSECUENCIAS DE SUBNUTRIR DURANTE EL DESARROLLO SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA.

Recientemente, Hales y Barker (1992) han propuesto una provocativa hipótesis que ya fue enunciada en 1962 por Neal (1962): "una nutrición deficiente en la etapa fetal y postnatal es negativa para el desarrollo y la función de las células B de los islotes de Langerhans. Este defecto de la estructura y función, que puede incluir rasgos de la anatomía de los islotes tales como la vascularización y la inervación, predispone al desarrollo posterior de una intolerancia a la glucosa y al posible desarrollo de diabetes". La base de esta hipótesis es la noción de que la función de las células B está disminuida como resultado de una malnutrición durante el periodo crítico de desarrollo de los islotes en la etapa perinatal.

Esta hipótesis ha sido criticada por Waldhäusl y Fasching (1993) y Dowse y cols. (1993) que han enfatizado que las poblaciones con mayor susceptibilidad para desarrollar diabetes son aquellas que tienen aumentada la función de las células B; además, según estos autores, el aumento de los niveles de insulina, y no la disminución, es lo que puede llevar al desarrollo de una intolerancia o la diabetes.

Por otro lado, también esta hipótesis se ve apoyada, al menos en parte, por algunos datos experimentales. Hoet y cols. (1992) mostraron que la administración de una dieta baja en proteínas durante la etapa gestante producía alteraciones en los fetos a término sobre algunos parámetros metabólicos (Snoeck y cols., 1990) que no se recuperaban normalmente con la realimentación de los animales (Darhi y cols., 1991); más recientemente, un estudio epidemiológico de Phipps y cols. (1993) ha mostrado la existencia de una asociación entre menor peso al nacimiento y desarrollo de intolerancia a la glucosa en la edad adulta.

Estos resultados, junto con las observaciones de Dörner y Plagemann (1992) que sugieren que un ligero impedimento de la tolerancia a la glucosa durante la gestación es un importante factor de riesgo para el desarrollo de susceptibilidad a la diabetes, nos llevaron a estudiar el efecto que sobre la secreción de insulina provocaba subnutrir en etapas de desarrollo como son la gestación y la lactancia.

4.4.1. Estudio de la secreción de insulina en ratas de 70 días de vida subnutridas en etapas de desarrollo.

Hemos visto hasta ahora como subnutrir a la madre gestante en el último tercio de la gestación afectaba la estructura y función del páncreas endocrino de los fetos. A los 21 días de gestación se produce un aumento en la masa de células B, un aumento de la insulina circulante y en páncreas y un aumento de la secreción de insulina *in vitro* en respuesta a la glucosa y los aminoácidos. Si estos animales se siguen subnutriendo hasta la edad adulta, los niveles de insulina circulantes aparecen disminuidos en presencia de niveles de glucosa normales y la respuesta secretora *in vivo* e *in vitro* se encuentra disminuida.

La pregunta que surge a la vista de estos resultados es si este efecto negativo de la subnutrición a largo plazo aparece también si la restricción se limita sólo a los periodos claves del desarrollo, como son la gestación y la lactancia, o si realmente se debe al hecho de subnutrir durante todo el periodo de estudio.

Para comprobar si la subnutrición en estas etapas provocaba un daño permanente de la función y estructura de las células B que pudiera predisponer al desarrollo de intolerancia a la glucosa en la edad adulta, estudiamos dos poblaciones de animales subnutridos: a) el grupo F que fue subnutrido sólo durante la última semana de la gestación y posteriormente realimentado hasta los 70 días de vida y b)

el grupo F+L que fue subnutrido durante la última semana de gestación y durante la lactancia y posteriormente realimentado hasta los 70 días de vida.

Como se mostró en la Fig 23, el peso corporal a los 70 días de vida se encontró disminuido en las ratas que fueron subnutridas durante las etapas fetal y lactante y no apareció alterado en las ratas subnutridas en la etapa fetal. En ninguna de las dos poblaciones se encontró alterada ni la glucemia ni el contenido de insulina en plasma y páncreas (Tabla 8). Dahri y cols. (1991) encontraron los mismos resultados en su modelo de subnutrición proteica comenzada desde el día 1 de gestación; cuando realimentaron a los animales, a partir del nacimiento, progresivamente fueron recuperando los niveles de glucemia e insulinemia para ser iguales que los controles a los 70 días de vida.

El test de tolerancia a la glucosa mostró como las dos poblaciones de animales subnutridas presentaron una curva de glucemia superior al de las ratas control; no obstante, el valor de las respuestas integradas de glucosa no fueron significativamente distintas (Fig. 24) lo que pone de manifiesto que en las dos condiciones de subnutrición las ratas presentan la misma tolerancia a la glucosa que las controles. La respuesta secretora de insulina fue igual para las tres poblaciones consideradas: F, F+L y control (Fig. 25); la comprobación *in vitro* mostró que los islotes de ambas poblaciones de animales subnutridos respondían de forma normal a los distintos secretagogos, si bien presentaron una disminución del contenido de insulina de los islotes (Fig. 26).

Aunque se ha puesto de manifiesto la importancia que subnutrir en etapas tempranas de desarrollo puede tener sobre la funcionalidad de las células B (Hales y Barker, 1992), estos resultados parecen indicar que apesar de la subnutrición, una vez se realimenta a los animales, éstos son capaces de recuperarse en cuanto a la

secreción de insulina. Rasschaert y cols. (1995) subnutriendo a animales durante toda la gestación y realimentándolos desde el nacimiento hasta la edad adulta no encontraron alteraciones en el contenido de insulina y proteínas de los islotes, ni en la concentración de insulina en plasma, ni en la liberación de la hormona *in vitro* ni en las actividades enzimáticas de los islotes; sí que se puso de manifiesto, en este modelo, una intolerancia a la glucosa que fue interpretada como un estado prediabético causado por la subnutrición durante la gestación (Dahri y cols., 1991). La diferencia con nuestro modelo de subnutrición podemos encontrarla en que la restricción en éstos es sólo proteica y que se comenzó desde el día 1 de gestación. Probablemente, los efectos de subnutrir desde el principio de la gestación, cuando se produce la embriogénesis y morfogénesis sean mayores que los obtenidos al subnutrir en la última etapa de la gestación donde se produce el crecimiento de las estructuras formadas en la primera etapa; de hecho, nuestros fetos de 21 días de gestación no mostraron las alteraciones tan graves encontradas en el modelo de Snoeck y cols. (1990) que subnutren durante toda la gestación.

Esta aparente recuperación de las ratas subnutridas puede deberse a la gran capacidad de las células B para crecer en la vida postnatal (Bunnag, 1966; Hellerström y Swenne, 1985), capacidad que se ha mostrado disminuye con la edad (Portha, 1990). Cantenys y cols. (1981) mostraron la regeneración de células B en el páncreas de ratas neonatales seguido de una destrucción de estas células por estreptozotocina. Swenne y cols. (1992) mostraron cómo el volumen de células B se recuperaba cuando a las ratas subnutridas se las realimenta, aunque la masa total se encuentre disminuida por el menor peso pancreático. Se puede pensar, que cuando se deja de subnutrir a los animales, todavía tienen capacidad para aumentar su masa de células B de forma que a los 70 días de vida no muestran de forma espontánea

una intolerancia a la glucosa. No obstante, al igual que hemos encontrado una disminución del contenido de insulina de los islotes, que no parece afectar a su capacidad secretora, no se puede descartar que, de alguna forma, la masa total de células B esté disminuida y en momentos límites de demanda insulínica, estas ratas quizás presenten una tolerancia a la glucosa decrecida.

4.5. ESTUDIO DE LAS CONSECUENCIAS DE CUATRO SEMANAS DE SUBNUTRICION, EN PERIODO ADULTO, SOBRE LA SECRECION DE INSULINA.

4.5.1. Características generales de las ratas subnutridas durante cuatro semanas en etapa adulta.

Las ratas subnutridas según este modelo, fueron alimentadas *ad libitum* durante las etapas fetal y lactante y hasta los 28 días de vida, momento en el que empezaron a recibir sólo el 35 % de lo que consumen diariamente las ratas controles. Este hecho provocó que las ratas subnutridas no crecieran de forma adecuada durante las cuatro semanas que duró la restricción (Fig. 27). Se confirman así los estudios previos que habían mostrado un completo cese de crecimiento de las ratas jóvenes sometidas a una dieta deficiente en proteínas o disminuida en cantidad (Wenderlich y cols., 1979; Levine y cols., 1983; Swenne y cols., 1987; Crace y cols., 1991). Creemos, que como consecuencia, quizá del decrecimiento de IGFs (somatomedinas) que se produce por la subnutrición (Rivero y cols, 1994; Thissen y cols., 1994).

Aunque en esta etapa los requerimientos de la dieta son menores que en las etapas fetal y lactante, Buchanam (1984) ya mostró que una deficiencia nutricional en este periodo origina retrasos importantes en el crecimiento. Se ha descrito que durante la malnutrición proteico-energética se inhibe tanto la replicación como el crecimiento en talla de las células (Cheek, 1985) y se produce una reducción del índice proteínas/DNA en muchos tejidos (Cheek y cols., 1970). Cuando se realimenta a los animales subnutridos, el crecimiento se recupera, pero no siempre se alcanza el peso corporal normal y muchos tejidos no muestran una talla celular adecuada (Cheek y cols, 1970; Swenne y cols, 1987).

Como era de esperar, la subnutrición de las ratas jóvenes durante cuatro semanas afectó también a la síntesis y secreción de insulina; ambos procesos es sabido que están regulados por la ingesta de comida (Edozien y cols., 1978). Como se observa en la Tabla 10, los valores de insulina plasmática aparecieron disminuidos después de dos semanas de restricción en las ratas subnutridas. Al principio, la caída de la insulinemia va acompañada de un contenido pancreático de la hormona normal, lo que indica una alteración de la secreción de insulina sin que aparentemente exista un defecto en la síntesis de la hormona; no obstante, apartir de la tercera semana el contenido de insulina en el páncreas de las ratas subnutridas se mostró de igual forma disminuido. Varios autores han encontrado también un menor contenido de insulina pancreática en la subnutrición (Clayssens, 1990), si bien, en algunos casos, esta disminución no fue acompañada de una insulinemia inferior (Anthony y Faloona, 1974; Khardory y cols., 1980). En nuestro caso, los animales subnutridos parecieron tener afectada al final de la subnutrición tanto la síntesis como la secreción de la hormona. Al igual que lo encontrado en el caso de las ratas subnutridas desde la etapa fetal hasta la edad adulta, las subnutrición entre la 4ª y 8ª semana de vida provocó una disminución de la insulina circulante, lo que puso de manifiesto una posible alteración funcional de la célula B pancreática; este último aspecto será discutido a continuación.

4.5.2. Secreción de insulina *in vivo* en ratas subnutridas durante cuatro semanas en la edad adulta.

Cuando se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa, las ratas subnutridas mostraron una glucemia superior a la de las ratas control a diez minutos de la sobrecarga del azúcar, con lo que la respuesta integrada de glucosa resultó estar

aumentada en los animales subnutridos (Fig. 28). No obstante, la diferencia de este parámetro, con respecto al valor control, es menor que lo que suele producirse en un estado de manifiesta intolerancia, como en una diabetes bien definida (Kergoat y cols., 1985). Este hecho, junto con la observación de las glucemias en el resto de los puntos permite concluir que la intolerancia que presentan las ratas subnutridas es de grado medio-moderado (Rodríguez, 1990). El análisis de la insulina (Fig. 29) tras la sobrecarga de glucosa, puso claramente de manifiesto que la hiperglucemia ocasionada por esta no induce la adecuada respuesta de secreción insulínica en las ratas subnutridas; el estímulo sobre la secreción de insulina fue mínimo o nulo, en estos animales, comparado con el pico manifiesto obtenido en sus controles. Estos resultados ponen más de manifiesto la existencia de una alteración funcional de las células B (Weinkowe y cols., 1976; Younoszai y Dixit, 1980; Levine y cols., 1983; Swenne y cols, 1987).

Durante la malnutrición proteico-calórica, la masa de los islotes (Weinkowe y cols, 1977) y la talla de células B (Platt y Stewart, 1967) se reducen y es posible que el páncreas endocrino no pueda mantener una adecuada respuesta insulino-secretora a la glucosa. No obstante, los estudios de recuperación nutricional de las ratas subnutridas realizados por Swenne y cols. (1987) muestran la habilidad de las células B para recuperar su respuesta insulino-secretora cuando se realimenta a los animales; si bien, no llegan a alcanzar el valor control. Además, como ya se comentó, la reducción de la masa de células B que tiene lugar en la subnutrición no es suficiente para explicar la total ausencia de respuesta secretora a la glucosa encontrada (Swenne y cols., 1992). Todo ello sugiere la existencia de un daño en el mecanismo secretor de la célula B más que una destrucción irreversible de éstas.

Es de destacar, que aunque la tolerancia a la glucosa estuvo impedida, los

niveles de la hexosa bajaron rápidamente a partir de los diez minutos de la sobrecarga a pesar de la respuesta tan disminuida de secreción de insulina. Esta observación podría sugerir un aumento de la utilización del azúcar y de la sensibilidad a la insulina, hecho que ha sido sugerido también por otros autores (Okitolonda y cols., 1988; Swenne y cols., 1988; Okitolonda y cols., 1987; Swenne y cols., 1987). Recordemos, además, que nuestro modelo de subnutrición comenzado desde la etapa fetal también provocó en edad adulta un incremento en la utilización periférica de glucosa y en la sensibilidad a la insulina (Escrivá y cols., 1992). Todos estos resultados apoyan que la alteración de la tolerancia a la glucosa durante la malnutrición proteico-energética parece producirse por una deficiencia en la secreción de insulina.

4.5.3. Estudio de la secreción de insulina *in vitro* en ratas adultas subnutridas durante cuatro semanas.

Acabamos de mostrar como los animales subnutridos entre la 4^a y 8^a semana de vida presentan una intolerancia a la glucosa acompañada de una marcada disminución de la secreción de insulina. Esta disminución de la insulino-secreción *in vivo* fue comprobada *in vitro* aislando islotes de estos animales subnutrido e incubándoles con glucosa, glucosa más arginina y leucina.

Como se muestra en la Fig 30a, el contenido de insulina de los islotes aislados se encontró disminuido significativamente en las ratas subnutridas entre la cuarta y octava semana de vida. Esta disminución está de acuerdo con la menor concentración de la hormona encontrada tanto en plasma como en páncreas. En la Fig. 30b se puede observar cómo la secreción basal de insulina (2.8 mM) se encontró ya disminuida en las ratas subnutridas y, por supuesto, la respuesta

insulino-secretora en todas las condiciones consideradas. Las observaciones de una disminución de la secreción basal de insulina y una reducida respuesta secretora a la glucosa y los aminoácidos en los islotes aislados pone de manifiesto una alteración en el funcionamiento de las células B.

Se ha descrito que el sistema efector de secreción de insulina no se encuentra alterado por la subnutrición (Dixit y Sorenson, 1987) y, por tanto, la alteración responsable se encontraría antes de la propia exocitosis de la hormona. Aunque las causas posibles de este defecto en el mecanismo secretor han sido ya discutidos en el apartado 4.3.3., los resultados experimentales con animales diabéticos (que tienen igualmente afectada la secreción de insulina), pueden aportar ideas sobre los sucesos que pueden estar implicados en esta alteración. Se ha descrito que la sensibilidad para la glucosa de los canales de potasio ligados a ATP están impedidos en las ratas diabéticas (Tsuura y cols., 1993), si bien, esta situación puede ser el resultado de una producción insuficiente de ATP causado por el impedimento del metabolismo de la glucosa más que por un defecto en los canales de potasio por sí mismos (Portha y cols., 1994). Aunque se ha implicado también al transportador de glucosa (Unger, 1991), ni este transporte ni la fosforilación del azúcar parecen desempeñar un papel primordial en el impedimento de la secreción de insulina en la diabetes. Al igual que en la subnutrición comenzada desde la etapa fetal, parece ser que la disminución de la enzima mitocondrial m-GDH y/o una deficiencia mitocondrial generalizada está subyacente en los modelos experimentales de diabetes (Giroix y cols., 1993). En resumen, la idea más sustentada es que el impedimento de la liberación de insulina en los modelos de diabetes experimental está claramente relacionado con un defecto en la glucólisis oxidativa. Ello conduce a una disminución del catabolismo mitocondrial oxidativo del piruvato derivado de la

glucolisis, se produce una disminución del índice ATP/ADP y una consecuente alteración de los sucesos iónicos acoplados al metabolismo de la glucosa en la célula B, como la disminución de la conductancia para el potasio (Portha y cols., 1994).

Por paralelismo con lo anteriormente expuesto, los resultados obtenidos en los modelos animales de subnutrición nos hacen pensar que la alteración en la secreción de insulina provocada por la subnutrición puede, en cierto sentido, evolucionar de forma similar a lo descrito para los animales diabéticos. Sin embargo, la investigación de dichos mecanismos en los animales subnutridos queda pendiente para investigaciones futuras.

Por último, es de destacar que si se comparan los resultados de las ratas subnutridas sólo en etapa adulta con los obtenidos en las que fueron subnutridas desde la etapa fetal, se puede observar que la respuesta secretora tanto *in vivo* como *in vitro* se encuentra mucho más afectada en aquellas. Parece que el efecto negativo de la subnutrición sobre la secreción de insulina fuese más acusado cuando la subnutrición se realiza entre la cuarta y octava semana de vida. La explicación la podemos encontrar en la adaptación a la subnutrición que experimentan las ratas que han sido subnutridas desde la etapa fetal. Dollet y cols. (1985) ya distinguieron los efectos de la subnutrición a corto y largo plazo, indicando que después de un periodo largo de restricción proteico-energética se produce una estabilización de las hormonas reguladoras como consecuencia de una adaptación progresiva del páncreas. Hecho que ha sido demostrado en nuestras ratas adultas subnutridas desde la etapa fetal.

4.6 EFECTO DE LA SUBNUTRICION SOBRE LOS NIVELES DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA. ESTUDIO EN MADRES, FETOS Y EN RATAS ADULTAS.

4.6.1. Efecto de la subnutrición sobre el transportador de glucosa GLUT-2.

La principal anomalía de las células B encontrada en la subnutrición es la disminución de la secreción de insulina (Crace y cols., 1991; Swenne y cols., 1987). Debido a que la respuesta insulino-secretora a la glucosa, principal estimulador de la secreción insulínica, depende de la captación del azúcar y de su metabolismo en la célula B (Meglasson y cols., 1986), parece interesante considerar si el transportador de glucosa puede estar afectado por la subnutrición. El transporte a través de la membrana plasmática de la célula B ocurre por difusión facilitada por medio de la proteína denominada GLUT-2. Funcionalmente, difiere de otros transportadores de glucosa por presentar una baja afinidad por la misma ($K_m = 17\text{mM}$) acompañada de una alta capacidad para su transporte ($V_{m\acute{a}x.}$) (Johnson y cols., 1990).

Este estudio tiene más interés por atribuirse un papel clave a la expresión de GLUT-2 en la activación por la glucosa que tiene lugar en las células B, previo a la secreción de insulina (Unger, 1991; Thorens, 1992). Más aún, se ha sugerido que la mala respuesta secretora a la glucosa, en distintos modelos de diabetes, puede estar correlacionada con una reducida expresión del transportador específico de las células B (GLUT-2) (Johnson y cols., 1990; Orci y cols., 1990; Thorens y cols., 1990; Thorens y cols., 1992).

No obstante, en un primer intento de cuantificar la cantidad de proteína GLUT-2, hemos encontrado que no parece existir una disminución muy acusada del transportador en las ratas subnutridas frente a las controles; si bien, hemos de

mencionar aquí, que los resultados obtenidos, en cuanto a los niveles de GLUT-2 y GLUT-1 en los islotes aislados, son preliminares y necesitaríamos más casuística para poder obtener conclusiones definitivas.

En cualquier caso, hay autores que sugieren que la disminución de GLUT-2 de los islotes en las ratas diabéticas es una consecuencia secundaria a otras anomalías metabólicas, más que una causa de disminución de la respuesta a la glucosa de las células B (Thorens y cols., 1992; Ohneda y cols., 1995). Según Tal y cols. (1992), la capacidad de transporte de los islotes no cultivados excede en 100 veces a la de la glucolisis; por tanto, la influencia del transporte de glucosa en la regulación de la glucolisis es muy pequeño. Esto indica que sólo cambios muy dramáticos del transportador pueden afectar al metabolismo de la glucosa y a la liberación de insulina inducida por ésta. Se ha descrito (Portha y cols., 1988; Malaisse, 1992) que se necesitaría que la actividad del transporte disminuyera 10 veces para reducir el metabolismo de la glucosa lo suficiente y perturbar así la secreción de insulina estimulada por glucosa. Según ello, aunque la magnitud de las diferencias que vamos a poder encontrar no son suficientes por sí mismas, probablemente, para explicar la reducción de la secreción de insulina mostrada en las ratas subnutridas, de estos resultados preliminares se descarta el transportador de glucosa como causa de la deficiente secreción de insulina.

4.6.2. Efecto de la subnutrición sobre el transportador de glucosa GLUT-1.

La medida del transporte de glucosa en los islotes aislados ha puesto de manifiesto que aproximadamente el 80% del transporte es llevado a cabo por el GLUT-2 (Johnson y cols., 1990). El 20% restante de actividad se ha atribuido a una proteína con una afinidad por el análogo no metabolizable de la glucosa, 3-O-

metilglucosa, similar a la descrita para la isoforma de GLUT-1 de eritrocitos. Aunque se había considerado que no se podía detectar mRNA de GLUT-1 en islotes no cultivados (Thorens y cols., 1988; Permutt y cols., 1989; Tal y cols., 1992), Yasuda y cols. (1992) detectaron dicho mRNA en islotes aislados frescos y sugirieron que la actividad transportadora de baja Km observada en los islotes era debida a la presencia de GLUT-1. Su localización es desconocida, pero, según estos autores, la gran sensibilidad de las células A a la glucosa comparada con las células B lleva a pensar que se puede expresar en las células A.

Aunque insistimos en que los resultados que presentamos son preliminares, parecen apuntar a que los niveles de GLUT-1 se encuentran aumentados, con respecto a los controles, en las madres gestantes subnutridas (Fig. 33) y en todas las condiciones de subnutrición consideradas en etapa adulta (Fig. 34). Resultados similares han sido encontrados en nuestro grupo (no publicados) en varios tejidos: cerebro, tejidos musculares y tejidos adiposos; en todos ellos, aparecen siempre niveles mayores de GLUT-1 en las ratas subnutridas. Se piensa que el GLUT-1 pertenece a la familia de las proteínas del estrés y que, por tanto, su expresión puede aparecer durante el estrés celular. Los niveles de GLUT-1 aumentan en las células B cuando se cultivan los islotes (Tal y cols, 1992; Yasuda y cols, 1992) y parece que esta inducción está provocada por el cultivo (Tal y cols, 1992; Wertheimer y cols., 1991). Así, las condiciones de cultivo celular u otros cambios metabólicos pueden desencadenar la inducción de GLUT-1 en muchos tipos celulares (Tal, Thorens y cols., 1992). En este sentido, y en favor de nuestros resultados, se ha descrito que aunque la mayoría de las células hepáticas expresan GLUT-2, el ayuno o la diabetes (situaciones ambas de estrés) causan una inducción de la expresión de GLUT-1 en células que antes no lo expresaban (Tal y cols., 1992).

En el caso de los fetos de 21 días de gestación no se pudo detectar GLUT-1; ello quizás sea debido a que la baja concentración de proteínas de los homogenados de islotes no nos permitió analizar más de 20 μ g de proteína en los experimentos de Western blotting (Fig 34). Esta situación es similar a lo descrito por otros autores (Tal y cols., 1992) que no detectaron niveles de GLUT-1 en islotes adultos no cultivados. Pensamos que se debe a que emplearon 30 μ g de proteína frente a los 60 μ g que hemos utilizado en nuestros experimentos (excluyendo los fetos). Por tanto, para la detección del GLUT-1, dado el carácter minoritario de esta proteína frente al GLUT-2, debe requerirse el análisis de cantidades más importantes de muestra.

CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES

- 1.- De los estudios realizados en ratas gestantes que han sido subnutridas en los distintos tercios de la gestación se concluye que los mayores efectos con respecto a la secreción de insulina parecen producirse cuando se subnutre en el último tercio; no existiendo, además, diferencias entre comenzar la restricción el día 14 ó el día 16 de gestación.
- 2.- La subnutrición durante el último tercio de la gestación provoca en la madre gestante una intolerancia a la glucosa acompañada de una disminución de la secreción de insulina *in vivo*. Sin embargo, el estudio de la respuesta insulino-secretora *in vitro* no revela la existencia de un defecto en los mecanismos secretores de las células B. Este hecho sugiere la intervención de factores o desequilibrios *in vivo* como causas posibles que inhiben en las madres gestantes subnutridas la normal respuesta secretora. Ello forma parte sin duda del conocido estado de resistencia a la insulina en las gestantes.
- 3.- Los fetos procedentes de madres que han sido subnutridas durante la última etapa de la gestación presentan a los 21 días un aumento del contenido de insulina en plasma y páncreas, una mayor respuesta insulino-secretora *in vitro* y un mayor porcentaje y masa de células B. Todo ello indica que la subnutrición de la madre durante el último tercio de la gestación provoca en sus fetos de 21 días un aumento del desarrollo y funcionalidad de las células B. Fenómeno que se parece a lo que ocurre en fetos de madres diabéticas.

- 4.- Cuando se subnutre a los animales desde la etapa fetal hasta los 70 días de vida, se produce un retraso en el crecimiento y, en consecuencia, un menor peso de cuerpo y de páncreas. A partir del nacimiento, y hasta la edad adulta, la concentración plasmática de insulina es más baja en los animales subnutridos sin que exista variación en cuanto a la concentración de la hormona en el páncreas. Estos hechos indican que los animales subnutridos muestran una deficiencia en la capacidad insulino-secretora sin que parezca existir ninguna perturbación en la síntesis de la hormona. Además, esta alteración en la respuesta secretora no se encuentra en la etapa fetal por lo que parece establecerse con posterioridad al nacimiento.
- 5.- El estudio *in vitro* de la respuesta insulino-secretora a los 70 días de vida de los animales subnutridos desde la etapa fetal hasta la edad adulta reveló la existencia de un defecto en los propios mecanismos secretores. Aunque la subnutrición provocó una disminución de la masa de células B en los animales a los 70 días de vida, esta situación no es del todo suficiente para explicar la severidad encontrada en la disminución de la respuesta insulino-secretora.
- 6.- Los animales que fueron subnutridos sólo en etapa fetal y posteriormente realimentados o bien en etapa fetal y lactante y posteriormente realimentados, no mostraron a los 70 días de vida ninguna alteración en la respuesta insulino-secretora *in vivo* ni *in vitro*. Estos resultados parecen indicar que a pesar de la subnutrición, una vez que se realimenta a los animales, éstos parecen recuperarse en cuanto a la secreción de insulina. Las alteraciones encontradas en animales adultos, cuando la subnutrición se continúa desde la

etapa fetal hasta los 70 días de vida, parecen deberse a una adaptación y alteración funcional y no a un mal desarrollo del páncreas producido en etapas inmaduras.

- 7.- La subnutrición de los animales durante cuatro semanas en edad adulta provoca una disminución del contenido de insulina en plasma y páncreas y de la respuesta insulino-secretora *in vivo* e *in vitro*. Estos resultados parecen apoyar más la conclusión de que las perturbaciones encontradas en las ratas subnutridas, desde la etapa fetal hasta la edad adulta, son consecuencia de una adaptación funcional a la falta directa de nutrientes y no a un daño permanente provocado en etapas de inmadurez. Además, el efecto negativo de la subnutrición sobre la secreción de insulina es más acusado cuando se subnutre durante cuatro semanas que cuando se subnutre desde la etapa fetal hasta la edad adulta. Esto parece indicar que después de un periodo largo de subnutrición proteico-energética la alteración funcional con respecto a la secreción de insulina se amortigua y estabiliza por adaptación del páncreas a la falta de nutrientes.
- 8.- La determinación de los niveles del transportador de glucosa en los islotes aislados de los animales controles y subnutridos, indican que la reducción en la secreción de insulina mostrada por las ratas subnutridas no parece deberse a una disminución del transportador de glucosa específico de las células B: GLUT-2. Se concluye, por tanto, que las causas posibles de la alteración en la respuesta insulino-secretora se encuentran en una perturbación en alguna etapa del metabolismo de la glucosa.

De manera global, del estudio realizado sobre las repercusiones en la secreción de insulina de la subnutrición, comenzada en etapas inmaduras, se establece el último tercio de la gestación como etapa clave a considerar.

Por otra parte, las alteraciones en la secreción de insulina de animales adultos subnutridos desde el periodo fetal, muestran que no parecen deberse a una consecuencia provocada por un mal desarrollo del páncreas sino a una adaptación funcional a la falta de nutrientes. Experimentos preliminares parecen descartar al transportador de glucosa de los islotes de Langerhans como causa de la alteración, por ello, los mecanismos por los cuales se produce dicha adaptación funcional quedan abiertos a investigaciones futuras.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- **Aerts, L; Van Assche, F.A.** Rat foetal endocrine pancreas in experimental diabetes. *J. Endocrinol.* 73: 339-346 (1977).
- **Aerts, L.; Van Assche, F.A.** Ultrastructural changes of the endocrine pancreas in pregnant rats. *Diabetologia* 11: 285-289 (1975).
- **Ahokas, S.; Anderson, G.D.; Lipshitz, J.** Effect of dietary restriction during the last week only or throughout gestation, on cardiac output and uteroplacental blood flow in pregnant rats. *J. Nutr.* 113: 1766-1776 (1983).
- **Aláez, M.C.** Actividad 5'-Desyodasa y regulación del axis tiroideo en rata subnutrida. *Tesis Doctoral. F. Farmacia, U. Complutense. Madrid, 1992.*
- **Alexander, M.H.; Lazan, K.S.; Rasmussen, K.M.** Effect of chronic protein-energy malnutrition on fecundability, fecundity and fertility in rats. *J. Nutri.* 118: 883-887 (1988).
- **Alvarez, E.; Fernández, S.; Blázquez, E.** Effect of maternal food restriction on circulating insulin and glucagon levels and on liver insulin and glucagon binding sites of fetal and suckling rats. *Diabete Metab.* 12: 337-345 (1986).
- **Anthony, L.E.; Faloona, G.R.** Plasma insulin and glucagon levels of protein malnourished rats. *Metabolism* 23: 303-306 (1974).
- **Ariyuki, F.** Growth retardation induced in rat fetuses by maternal fasting and massive doses of ergocalciferol. *J. Nutri.* 117: 342-348 (1987).
- **Arola, L.I.; Palou, A.; Remesar, X.; Alemany, M.** Effects of 24-hours starvation on plasma composition in 19 and 21 day pregnant rats and their fetuses. *Hormone metabol. Rese.* 14: 364-371 (1982).
- **Ashworth, M.A.; Kerbel, N.C.; Haist, R.E.** Effect of chronic caloric

- insufficiency on the growth of the islets of Langerhans. *Am. J. Physiol.* 171: 25-28 (1952).
- **Avrameas, S; Ternynck, T.** Peroxidase labelled antibody an Fab conjugates enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry.* 8: 1174-1179 (1971).
 - **Bailey, C.J.; Sorour, A.** Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis -effect of insulin secretion. *Diabetologia* 19: 475-481 (1980).
 - **Banting, F.G.; Best, C.H.** The internal secretion of the pancreas. *Journal Lab. Clin. Med.* 7: 465-480 (1922).
 - **Bar, R.S.; Boes, M.; Yorck, M.** Processing of insulin-like growth factors I and II by capillary and large vessel endothelial cells. *Endocrinology* 118: 1072-1080 (1986).
 - **Bar, R.S.** Interactions of insulin and insulin-like growth factors (IGFs) with endothelial cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 401: 150-162 (1982).
 - **Baum, J.; Simon, B.E.; Unger, R.H.; Madison, L.L.** Localization of glucagon in the alpha cells in the pancreatic islets by immunofluorescent techniques. *Diabetes* 11: 371-374 (1962).
 - **Beaton, G.H.; Beare, J.; Ryn, H.M.; Mc Henry, E.W.** Protein metabolism in the pregnant rat. *Journal. Nutr.* 54: 291-304 (1954).
 - **Becker, D.J.** The endocrine responses to protein-calorie malnutrition. *Ann. Rev. Nutr.* 3: 187-212 (1983).
 - **Becker, D.J.; Pimstone, B.L.; Hansen, J.P.L.; Mc Hutchon, B.; Drysdale A.** Patterns of insulin response to glucose in protein-calorie malnutrition. *American Journal of Clin. Nutr.* 25: 499-505 (1972).
 - **Becker, D.J.; Pimstone, B.C.; Hansen, J.D.L. y Hendricks, S.** Insulin secretion in protein-calorie malnutrition. Quantitative abnormalities and response to

- treatment. *Diabetes* 20: 542-551 (1971).
- **Berggren, P.O.; Rorsman, P.; Efendic, S.; Östenson, C-G.; Flatt, P.R.; Nilsson, T.; Arkhammar, P.; Juntti-Berggren, L.** Mechanisms of action of enteroinsular hormones, islet peptides and neuronal input on the insulin secretory process. *En Nutrient Regulation of insulin secretion. Flatt, P.R. ed. London, Portland Press. pp289-318 (1992).*
 - **Berkowitz, D.** Metabolic changes associated with obesity before and after weight reduction. *Am. J. Med. Assoc.* 187:339 (1964).
 - **Best, H.C.; Haist, R.E.; Ridout, J.E.** Diet and the insulin content of pancreas. *J. Physiology* 97:107-119 (1939).
 - **Best, L.; Malaisse, W.J.** Phospholipids and islet function. *Diabetologia* 25: 299-305 (1983).
 - **Bihoreau, M.T.; Ktorza, A.; Kervran, A.; Picon, L.** Effect of gestational hyperglycemia on insulin secretion in vivo and in vitro by fetal rat pancreas. *Am. J. Physiol.* 251: E86-E91 (1986).
 - **Billestrup, N.; Nielsen, J.H.** The stimulatory effect of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on B-cell proliferation is not mediated by insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 130: 1459-1466 (1992).
 - **Bloom W.** New types of granular cell in islets of Langerhans of man. *Anat. Rec.* 49: 363-371 (1931).
 - **Bonner-Weir, S.; Smith, F.E.** Islet cell growth and the growth factors involved. *Trends Endocrin. Metab.* 5: 60-64 (1994).
 - **Bonner-Weir, S.; Trent, D.F.; Honey, R.N.; Weir, G.C.** Responses of neonatal rat islets to streptozotocin. Limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes* 30: 64 (1981).

- **Bone, A.J.; Taylor, K.W.** Metabolic adaptation to pregnancy shown by increased biosynthesis of insulin in islets of Langerhans. *J. Endocrin.* 54: 317-325 (1976).
- **Bonet, B.; Herrera, E.** Different response to maternal hypothyroidism during the first and second half of gestation in the rat. *Endocrinology* 122: 450-456 (1988).
- **Boschero, A.C.; Crepaldi, S.C.; Carneiro, E.M.; Delettre, E.; Atwater, I.** Prolactin induces maturation of glucose sensing mechanism in cultured neonatal rat islets. *Endocrinology* 133: 515-520 (1993).
- **Bourne, A.R.; Whaler, B.L.; Yudking, J.** Plasma insulin response in pregnant and non-pregnant rats: effects of different dietary carbohydrates. *Diabetol.* 15: 37-40 (1978).
- **Bowie, M.D.** Intravenous glucose tolerance in kwashiorkor and marasmus. *S. Afr. Med. J.* 38: 328-329 (1964).
- **Bradford, M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254 (1976).
- **Breant, B.; Lavergne, C.; Asterano, A.; Ferrand, N.; Asfari, M.; Boissard, C.; Anteunis, A.; Rosselin, G.** Development of the beta cells. *J. Med.* 59: 175-185 (1992).
- **Brelje, T.C.; Scherp, D.W.; Lacy, P.E.; OGren, L.; Talamantes, T.; Robertson, M.; Friesen, H.G.; Sorenson, R.T.** Effect of homologous placental lactogens, prolactins and growth hormone on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse and human islets: implication for placental lagtogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology* 132: 879-887 (1993).
- **Brelje, T.C.; Sorenson, R.L.** Role of prolactin versus growth hormone on islet B-cell proliferation in vitro: implications for pregnancy. *Endocrinology* 128: 45-47

(1991).

- **Buchanan, N.** Effect of protein-energy malnutrition on drug metabolism in man. *World Rev. Nutr. Diet* 43:129-139 (1984).
- **Bunnang, S.C.** Postnatal neogenesis of islets of Langerhans in the mouse. *Diabetes* 15: 480-491 (1966).
- **Cacho, J.** Acción de la insulina sobre la utilización de glucosa *in vivo* en ratas sometidas a subnutrición proteico-energética desde la etapa fetal. *Tesis Doctoral. F. Farmacia, U. Complutense. Madrid, 1993.*
- **Cantenys, D.; Portha, B.; Dutrillaux, M.C.; Hollende, E.; Rozé, C.; Picon, L.** Histogenesis of the endocrine pancreas in newborn rats after destruction by streptozotocin. *Virchows Archi.* 35: 109-122 (1981).
- **Cheek, D.B.; Hill, D.E.; Cordano, A.; Graham; G.G.** The control of cell mass and replication. The DNA unit -a personal 20 year study-. *Early Humasn Development* 12: 211-239 (1985).
- **Claeysens, S.; Lavoine, A.; Vaillant, C.; Rakotomanga, J.A.; Bois-Joyeux, B.; Peret, J.** Metabolic changes during early starvation in rats fed a low-protein diet in the postweaning period. *Metabolism* 41: 722-727 (1992).
- **Claeysens, S.; Lavoine, A.; Fresel-Ragot, M.; Bois-Joyeux, B.; Chanez, M.; Perret, J.** Metabolic changes in rats fed a low protein diet during post weaning growth. *Metabolism* 39: 676-681 (1990).
- **Costrini, N.V.; Kalkoff, R.K.** Relative effects of pregnancy estradiol and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 50: 992-999 (1971).
- **Crace, C.J.; Swenne, I.; Milner, R.D.G.** Long-term effects on glucose tolerance and insulin secretory response to glucose following a limited period of severe

- protein or energy malnutrition in young rats. *Upsala J. Med. Sci.* 96: 177-183 (1991).
- **Crnic, L.S.; Chase, H.P.** Models of infantile undernutrition in rats: effects on milk. *J. Nutr.* 108: 1755-1760 (1978).
 - **Crowe, P.J.; Royle, G.T.** Glucose kinetics in protein depletion. Effect of glucose infusion in the fasted rats. *J. Nutr.* 118: 1240-1244 (1988).
 - **Dahri, S.; Cherif, H.; Reusens, B.; Remacle, C.; Hoet, J.J.** Effect of a isocaloric low protein during gestation in rat on the in vitro insulin secretion by islets of the offspring. *Diabetologia* 37: A80 (1994).
 - **Dahri, S.; Snoeck, A.; Reusens-Billen, B.; Remacle, C.; Hoet, J.J.** Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes* 40 (supl. 2): 115-120 (1991).
 - **Del Prato, S.; Ferranini, E.; De Fronzo, R.A.** Evaluation of insulin sensitivity in man. *En: Methods in diabetic research Vol I; Laboratory methods, part C. Eds. J. Wiley y Sons. pp36-75 New York, 1984.*
 - **Dixit, P.K.; Sorenson, R.L.** Effect of protein malnutrition on insulin secretion. *J. Med. Res.* 86:663-670 (1987).
 - **Dixit, P.K.; Kaung, H.L.C.** Rat pancreatic beta cells in protein deficiency: A study involving morphometric analysis and alloxan effect. *J. Nutr.* 115:375-382 (1985).
 - **Dollet, J.M.; Beck, B.; Max, J.P.** Protein-energy malnutrition in pregnant rats improves the adaptation of the endocrine pancreas in malnourished offspring and induces insulin resistance after rehabilitation. *Br. J. Nutr.* 58: 415-425 (1987).
 - **Dollet, J.M.; Beck, B.; Villaume, C.; Max, J.P.; Debry, G.** Progressive adaptation of the endocrine pancreas during long-term protein deficiency in rats:

- effects on blood glucose homeostasis and on pancreatic insulin, glucagon and somatostatin concentrations. *J. Nutr.* 115: 1581-1588 (1985).
- **Dörner, G.; Plagemenn, A.** Perinatal hyperinsulinism as posible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm. Metab. res.* 26: 213-221 (1994).
 - **Dowse, J.K.; Zimmet, P.Z.; Alberti, R.G.H.M.** Infant nutrition and subsequent risk of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36: 267 (1993).
 - **Edozien, J.C.; Niehaus, N.; Mar, M.H.; Makaovi, T.; Switzar, B.R.** Diet-hormone interrelationship in the rat. *J. Nutri.* 108: 1767-1776 (1978).
 - **Ellington, S.K.L.** In vivo and in vitro studies on the effects of maternal fasting during embryonic organogenesis in the rat. *J. Reprod. Fertil.* 60: 383-388 (1980).
 - **Epple, A.; Brinn, J.E.** The comparative physiology of the pancreatic islets. *En: Zoophysiology. Eds. Farne D.S. pp47-65 Springer-Verlag, New York, 1987.*
 - **Eriksson, W.J.; Swenne, I.** Diabetes in pregnancy: fetal macrosomia, hiperinsulinism and islet hyperplasia in the offspring of rats subjected to temporary protein-energy malnutrition early in life. *Pediatric Research* 34: 791-795 (1993).
 - **Erikson, V.; Swenne, I.** Diabetes in pregnancy: growth of the fetal B-cell in the rat. *Biol. Neonate* 42: 239-242 (1982).
 - **Escrivá, F.; Rodríguez, C.; Cacho, J.; Alvarez, C.; Portha, B.; Pascual-Leone, A.M.** Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction. *Am. J. Physiol.* 263: E 1-E 7 (1992).
 - **Escrivá, F.; Kergoat, M; Bailbé, D.; Pascual-Leone, A.M.; Portha, B.** Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. *Diabetología* 34: 559-564 (1991).

- **Escrivá, F.; Rodríguez, C.; Alvarez, C.; Pascual-Leone, A.M.** Glucose homeostasis in suckling rats undernourished during intrauterine life. En: *Endocrine and biochemical development of the fetus and neonate* .Pgs.: 55-56. Eds.: J.M. Cuezva, A.M. Pascual-Leone, S.M. Patel. Plenum Press, New York, 1990.
- **Flatt, P.R.; Barnett, C.R.B.; Shibien, O.; Swanston-Flatt, S.K.** Direct and indirect actions of nutrients in the regulation of insulin secretion from the pancreatic beta cells. *Proceedings of the Nutrit. Society* 50:559-566 (1991).
- **Gabr, M.** Malnutrition during pregnancy and lactation. *Review Nutr. Diet* 36:90-99 (1981).
- **Galler, J.R.; Propert, K.J.** The effect of protein deficiency on weight gain and body composition in the developing rat. *Nutr. Reports Inter.* 24: 885-892 (1981).
- **Gasparo, M.; Milner, G.R.; Norris, P.D.** Effects of glucose and amino acids on foetal rat pancreatic growth and insulin secretion *in vitro*. *J. Endocrinol.* 77:241 (1978).
- **Gerich, J.E.; Charles, M.A.; Grodsky, G.M.** Regulation of pancreatic insulin and glucagon secretion. *Annual Reviews of Physiology* 38:353-388 (1976).
- **Girard, J.** Hormonal regulation of fetal growth. En: *Intrauterine growth retardation*. Ed.: Jacques Senterre. Nestlé Nutrition Workshop Series. vol. 18. Nestec Ltd., Vevey/Raven Press. Ltd., New York (1989).
- **Girard, J.; Ferré, P.** Metabolic and hormonal changes around birth. En: *Biochemical development of the fetus and neonate*. Eds. Jones. pp517-551; Elsevier, Amsterdam 1982.
- **Girard, J.R.; Ferré, P.; Gilbert, M.; Kervran, A.; Assan, R.; Marliss, E.B.** Fetal metabolic response to maternal fasting in the rat. *Am. J. Physiol.* 232: E 456-E 463 (1977).

- **Girard, J.R.; Rieutort, M.; Kervran, A.; Jost, A.** Hormonal control of fetal growth with particular reference to insulin and growth hormone. *En: Perinatal medicine. Eds. Rooth, G; Bratchy, LE; pp197-202. Stockholm: almquist and Wicksell, 1976.*
- **Giroix, M.H.; Sener, A.; Portha, B.; Malaisse, W.J.** Preferential alteration of oxidative to total glycolysis in pancreatic islets of two rat models of inherited or acquired type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia 36: 305-309 (1993).*
- **Giroix, M.H.; Vesco, L.; Portha, B.** Functional and metabolic perturbations in isolated pancreatic islets from the GK rat, a genetic model of non-insulin-dependent diabetes. *Endocrinology 132: 815-822 (1993).*
- **Giroix, M.H.; Rasschaert, J.; Bailbe, D.; Leclercq-Meyer, V.; Sener, A.; Portha, B.** Impairment of glycerol phosphate shuttle in islets from rats with diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabetes 40: 227-232 (1991).*
- **Goto, Y.; Nalayama, Y.; Yapi, T.** Influence of World War II food shortages on the incidence of Diabetes Mellitus in Japan. *Diabetes 7:133 (1958).*
- **Green, H.; Morkawa, M.; Nixon, T.** A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation 29: 195-198.*
- **Green, I.C.; Perrin, D.; Howell, S.L.** Insulin release in isolated islets of Langerhans of pregnant rats: relationship between glucose metabolism and cyclic AMP. *Horm. Metab. Res. 10: 32-35 (1978).*
- **Green, I.C.; Taylor, K.W.** Insulin secretory response of isolated islet of Langerhans in pregnant rats: effects of dietary restriction. *J. Endocrin. 62: 137-143 (1974).*
- **Green, I.C.; Taylor, K.W.** Effects of pregnancy in the rat on size and insulin

- secretory response of the islets of Langerhans. *J. Endocrinol.* 54: 317-325 (1972).
- **Grigor, M.R.; Allan, J.E.; Carrington, J.M.; Carne, A.; Guersen, A.; Young, D.; Thompson, M.P.; Haynes, E.B.** Effect of dietary protein and food restriction on milk production and composition, maternal tissues and enzymes in lactating rats. *J. Nutr.* 117: 1247-1258 (1987).
 - **Grimelius, L; Polak, J.M.; Solcie, E.; Pearce, A.G.E.** The entero-glucagon cell. *En: Bloom Sr, eds. Gut Hormones. Edinburgh: Churchill Livingstone pp365-368 (1978).*
 - **Hales, C.N.; Barker, D.J.P.** Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35: 595-601 (1992).
 - **Heggestad, C.; Morgan, C.R.; Lazarow, A.** Insulin levels in maternal and fetal plasma from normal and alloxan rats near term. *Anat. Rec.* 151:455 (1965).
 - **Heinze, E.; Steinke, J.** Insulin secretion during development: response of isolated pancreatic islets of fetal, newborn and adult rats to theophylline and arginine. *Horm. Metab. Res.* 4: 234 (1972).
 - **Hellerstrom, C.; Swenne, I.** Growth pattern of pancreatic islets in animals. *En: The diabetic pancreas. Eds. Volk, BW; Arquilla, ER. pp55-79. New York, Plenum, 1985.*
 - **Hellerstrom, C.** The life story of the pancreatic beta cell. *Diabetologia* 26:393 (1984).
 - **Hellerstrom, C.; Sweeney, I.; Andersson, A.** Islet cell replication and diabetes. *En Lefebure, P.J.; Pipeleers, D.G., eds. Heidelberg, Germany, Springer-Verlag. pp141-170 (1980).*
 - **Hellerstrom, C.; Lewis, N.J.; Borg, H.; Johnson, R.; Freinkel, N.** Method for

- large-scale isolation of pancreatic islets by tissue culture of fetal rat pancreas. *Diabetes* 28:769-776 (1979).
- **Hellerstrom, C.** Growth pattern of pancreatic islets in animals. *In The diabetic pancreas. Volk, BW and Wellman KR Eds. New York, Pelnum, p 61 (1977).*
 - **Hellman, B.** The islets of Langerhans in the rat during pregnancy and lactation, with special reference to the changes in the B/A cell ratio. *Acta Obstet. Gynecol Scand* 39: 331-342 (1960).
 - **Henquin, J.C.** Les mécanismes cellulaires du contrôle de la sécrétion d'insuline. *Archives internationales de Physiol. et de Bioch.* 98:3 A61-A80 (1990).
 - **Henquin, J.C.** Regulation of insulin release by ionic and electrical event in beta cell. *Hormone Research* 27:168-178 (1987).
 - **Henquin, J.C.; Meissner, H.P.** Cyclic adenosine monophosphate differentially affects the response of mouse pancreatic B-cells to various amino acids. *Journal of Physiology* 381: 77-93 (1986).
 - **Herrera, E.** Aspectos básicos de las adaptaciones metabólicas en la madre durante la gestación y relaciones materno-fetales. *En: Bioquímica Perinatal (aspectos básicos y patológicos). Eds. E. Herrera; Fundación Ramón Areces, pp17-39. Madrid, 1988.*
 - **Herrera, E.; Knopp, R.H.; Freinkel, N.** Carbohydrate metabolism in pregnancy VI. Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis and nitrogen metabolism during late gestation in the fed and fasted rat. *J. Clin. Invest.* 48: 2260-2272 (1969).
 - **Hoet, J.J.; Snoeck, A.; Darhi, S.; Reusens, B.; Remacle, C.** Maternal environment and low protein diets: their effects on the offspring. *IDF Bulletin* 37: 3 (1992).

- **Hole, R.L.; May, C.; Pian-Smith, M.; Sharp, G.W.G.** Development of the biphasic response to glucose in fetal and neonatal rat pancreas. *Am. J. Physiol.* 254: E 167 (1988).
- **Hopcroft, D.W.; Mason, D.R.; Scott, R.S.** Standardization of insulin secretion from pancreatic islets: validation of a DNA assay. *Horm. Metabol. Res.* 17: 559-561 (1985).
- **Jellife, D.B.; Jellife, E.F.P.** The volume and composition of human milk in poorly-nourished communities. *American Journal of Clin. Nutr.* 31:492-515 (1978).
- **Johnson, J.H.; Newgard, C.B.; Milburn, J.L.; Lodish, H.F.; Thorens, B.** The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has identical primary sequence. *J. Biol. Chem.* 265: 6548-6551 (1990).
- **Jones, C.T.** Fetal-placental interactions in the control of prenatal growth. *En: Endocrine and biochemical development of the fetus and neonate. Eds. JM Cuezva, AM Pascual-leone, MS Patel. pp265-276. Plenum Press. New York, 1990.*
- **Joost, H.G. Beckmann, J.** On the relation of glucose and insulin secretion in the fasting state. *etabolism* 29:1 23-27 (1980).
- **Jovanovic-Peterson, L.; Peterson, C.M.** Pregnancy and the endocrine pancreas. *En: The endocrine pancreas. Eds. Samols, E. pp229-252 Raven Press, New York 1991.*
- **Kalkhoff, R.K.** Impact of maternal fuels and nutritional state on fetal growth. *Diabetes* 40 (suppl.2): 61-65 (1991).
- **Khardori, R.; Bajaj, J.S.; Deo, M.G.; Bansal, D.D.** Insulin secretion and carbohydrate metabolism in experimental protein malnutrition. *J. Endocrinol.*

Invest. 3: 273-278 (1980).

- **Kergoat, M.; Portha, B.** In vivo hepatic and peripheral insulin sensitivity in rats with non-insulin-dependent diabetes induced by streptozotocin. Assessment with the insulin-glucose clamp technique. *Diabetes 34: 1120-1126 (1985).*
- **King, D.L.; Chick, W.L.** Pancreatic beta cell replication: effects of hexose sugars. *Endocrinology 99: 1003-1009 (1976).*
- **King, D.L.; Kitchen, K.L.; Chick, W.L.** Pancreatic B-cell replication: relation to insulin secretion. *Endocrinology 103: 1321-1327 (1976).*
- **Koski, K.G.; Hill, F.W.** Evidence for a critical period during late gestation when maternal dietary carbohydrate is essential for survival of newborn rats. *J. Nutr. 120: 1016-1027 (1990).*
- **Koski, K.G.; Hill, F.W.; Lönnerdal, B.** Altered lactational performance in rats fed low carbohydrate diets and its effect on growth of neonatal rat pups. *J. Nutr. 120: 1028-1036 (1990).*
- **Labarca, C.; Paigen, K.** A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Analytical Biochem. 102: 344-352 (1980).*
- **Lacy, P.E.** Electron microscopic and fluorescent antibody studies on islets of Langerhans. *Exp. Cell Res. 7: 296-308 (1959).*
- **Laemmli, U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature 227: 680 (1970).*
- **Lafson, N.; Kramlinger, K.G.; Mayrand, R.R.; Lender, E.J.** Blood flow to the rabbit pancreas with special reference to the islets of Langerhans. *Gastroenterology 79: 466-473 (1980).*
- **Landreth, K.S.; Narayanan, R.; Dorshkind, K.** Insulin-like Growth factor-I regulated pro-Bcell differentiation. *Blood 80:5 1207-1212 (1992).*

- **Laury, M.C.; Takao, F.; Bailbe, D.; Penicaud, L.; Portha, B.; Picon, L.; Ktorza, A.** Differential effects of prolonged hiperglycemia on *in vivo* and *in vitro* insulin secretion in rats. *Endocrinology* 128:2526-2533 (1991).
- **Laycock, S.G.** Glucose metabolism, second messengers and insulin secretion. *Life sciences* 47:2307-2316 (1990).
- **Leturque, A.; Burnol, A.F.; Ferré, P.; Girard, J.** Pregnancy-induced insulin resistance in the rat: assesment by glucose clamp technique. *Am. J. Physiol.* 246: E25-E31 (1984).
- **Levine, L.S.; Wright, P.G.; Marcus, F.** Failure to secrete immunoreactive insulin by rats fed a low protein diet. *Acta Endocrinol.* 102: 240-245 (1983).
- **Logothetopoulos, J. Valiquette, N.; Cuet, D.** Glucose stimulation of beta cell DNA replication in the intac rat and in pancreatic islets in suspension culture. *Diabetes* 32: 1172 (1983).
- **López Luna, P.; Muñoz, T.; Herrera, E.** Body fat in pregnant rats at mild and late gestation. *Life Sciences* 39: 1389-1393 (1986).
- **Malaisse, W.J.** Is type 2 diabetes due to a deficiency of FAD-linked glycerophosphate dehydrogenase in pancreatic islets?. *Acta Diabetol.* 30: 1-5 (1993).
- **Malaisse, W.J.** Regulation of insulin secretion by nutrients: D-glucose metabolism in islet cells. *En Nutrient Regulation of insulin secretion.* Flatt, P.R. ed. London, Portland Press. pp83-100 (1992).
- **Malaisse, W.J.; Malaisse-Lagae, F.; Sener, A.** Coupling factors in nutrient-induced insulin release. *Experientia* 40:1035-1042 (1984).
- **Malaisse, W.J.; Hutton, J.C.; Kawazu, S.; Herdivelz, A.; Valverde, I.; Sener, A.** The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release XXXV The

- links between metabolic and cationic events. *Diabetologia* 16:331-341 (1979).
- **Malaisse, W.J.; Sener, A.; Levy, J.** The stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release. Fasting induced adaptation of key glycolytic enzyme in isolated islets. *J. Biol. Chem.* 251: 731-737 (1976).
 - **Malaisse, W.J.; Malaisse-Lagae, F.; Picard, C.; Flament-Durand J.** Effect of pregnancy and chorionic growth hormone upon insulin secretion. *Endocrinology* 84: 41-44 (1969).
 - **Malaisse-Lagae, F.; Malaisse, W.J.** Insulin release by pancreatic islets. In: *Larner, J.; Pohl, S.L. (eds). Methods in diabetes research, part B. Wiley and sons, New York vol 1:147 (1984).*
 - **Mann, M.D.; Becker, D.J.; Pimstone, B.L.; Hansen, J.D.L.** Potassium supplementation serum immunoreactive insulin concentrations and glucose tolerance in protein-energy malnutrition. *Br. J. Nutr.* 33:55-61 (1975).
 - **Martin, A.; Zorzano, A.; Caruncho, I.; Herrera, E.** Glucose tolerance tests and in vivo response to intravenous insulin in the unanesthetized late pregnant rat and their consequences to the fetus. *Diabete. Metab.* 12: 303-307 (1986).
 - **Marynissen, G.; Aerts, L.; Van Assche, F.A.** The endocrine pancreas during pregnancy and lactation in the rat. *J. Devel. Physiol.* 5: 373-381 (1983).
 - **Matschinsky, F.M.; Ellerman, J.; Stillings, S.; Raybaud, F.; Pace, C.; Zanalich, W.** Hexoses and insulin secretion. In: *Insulin. Eds. Harrelblatt, A.; Bruchhansen, F.V. Springer-Verlag, Heidelberg. Part. 2, 79-114 (1975).*
 - **Mayor, F.; Cuezva, J.M.** Hormonal and metabolic changes in the perinatal period. *Biol. Neonate* 48: 185-196 (1985).
 - **Mc Cance, R.A.; Widdowson, E.M.** Protein deficiencies and calorie deficiencies. *Lancet* 2: 158-159 (1966).

- **Mc Cusky, R.S.; Chapman, T.S.** Microscopy of the living pancreas in situ. *Am. J. Anat.* 126: 395-408 (1969).
- **Mc Evoy, R.** Changes in the A- B- and C-cell populations in the pancreatic islets during the postnatal development of the rat. *Diabetes* 30: 813 (1981).
- **Meglasson, M.D.; Matschinsky, F.M.** Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab. Rev.* 2: 163-214 (1986).
- **Mello, M.A.R.; Cury, L.** Maternal adaptations for fetal growth in young malnourished rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 21: 1053-1056 (1988).
- **Michel, C.; Cheriot, J.; Souchard, M.; Rozé, C.** Modifications of the endocrine pancreas in rats after ethionine destruction of acini. *Cell mol. Biol.* 28: 135-148 (1982).
- **Milner, R.D.G.; Hill, P.J.** Fetal growth control: the role of insulin and related peptide. *Clin. Endocrinol.* 21: 415 (1984).
- **Milner, R.D.G.** Metabolic and hormonal responses to glucose and glucagon in patients with infantile malnutrition. *Pediatric Research* 5: 33-39 (1971).
- **Moldrup, A.; Peterson, E.D.; Nielsen, J.H.;** Effects of sex and pregnancy hormones on growth hormone and prolactin receptor gene expression in insulin-producing cells. *Endocrinology* 133: 1165-1172 (1993).
- **Morgan, L.M.** Insulin secretion and the enteroinsular axis. *En Nutrient Regulation of insulin secretion.* Flatt, P.R. ed. London, Portland Press. pp125-156 (1992).
- **Morgan, N.G.; Montagne, W.** Phospholipids and insulin secretion. *En Nutrient Regulation of insulin secretion.* Flatt, P.R. ed. London, Portland Press. pp125-156 (1992).
- **Morgane, P.J.; Miller, M.; Kempes, T.; Stern, W.C.; Forhes, W.B.; Hall, R.; Bronzina, J.D.; Kissane, J.; Hawrylewicz, E.; Resnick, O.** The effects of

- protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosc. Bio-behav. rev.* 2:137-230 (1978).
- Mourmeaux, J.L.; Remacle, C.; Henquin, J.C. Morphological and functional characteristics of islets neoformed during tissue culture of fetal rat pancreas. *Mol. Cell Endocrin.* 30: 237-246 (1985).
 - Neal, J.V. Diabetes mellitus: a thrifty genotype rendered detrimental by "progress"? *Am. J. Human Genet.* 14: 353-362 (1962).
 - Nielsen, J.H.; Moldurp, A.; Billestrup, N.; Peterson, E.D.; Allevato, G.; Stahl, M. The role of growth hormone and prolactin in beta cell growth and regeneration. *En: Advances in experimental medicine and biology. Eds. Vinik AI. pp9-17 Plenum Press, New York, 1992.*
 - Nielsen, J.H. Effects of growth hormone, prolactin and placental lactogen on insulin content and release and deoxyribonucleic acid synthesis in cultured pancreatic islets. *Endocrinology* 110: 600-606 (1982).
 - Ohneda, M.; Inman, L.R.; Unger, R.H. Caloric restriction in obese pre-diabetic rats prevents B cell depletion, loss of B cell GLUT-2 and glucose incompetence. *Diabetologia* 38: 173-179 (1995).
 - Okitolonda, W.; Brichard, S.M.; Pottier, A.M.; Henquin, J.C. Influence of low-and high-protein diets on glucose homeostasis in the rat. *British J. Nutr.* 60: 509-516 (1988).
 - Okitolonda, W.; Brichard, S.M.; Henquin, J.C. Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat. *Diabetologia* 30: 946-951 (1987).
 - Oliver, J.R.; Williamns, V.; Wright, P.H. Effects of fasting on insulin and glucagon secretion by isolated rat islets of Langerhans. *Prooced. of the Society for*

- Exper. biology and medicine* 154:210-214 (1977).
- **Orci, L.; Unger, R.H.; Ravazzola, M.; Ogawa, A.; Komiye, I.; Baetens, D.; Lodish, H.F.; Thorens, B.** Reduced B-cell glucose transporter in new onset diabetic BB rats. *J. Clin. Invest.* 86: 1615-1622 (1990).
 - **Orci, L.; Varelli, J.D.; Perrelet, A.** La fábrica de insulina. *Investigación y Ciencia* 156:52-63 (1988).
 - **Orci, L.; Baeteus, P.; Dubois, M.P.; Rufaner, C.** Evidence for the D-cell of the pancreas secreting somatostating. *Horm. Metab. Res.* 7: 400-402 (1975).
 - **Parsons, J.A.; Brelje, T.C.; Sorenson, R.L.** Adaptation of islets to pregnancy: increased islet proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130: 1459-1466 (1992).
 - **Parsons, J.A.; Hertfel, M.A.; Hegre, O.B.; Mc Evoy, P.C.** Effect of MtTw15 mammosomasotropic tumors on pancreatic islet hormones. *Diabetes* 32: 67-74 (1983).
 - **Pascual-Leone, A.M.; Goya, L.; Aláez, C.; Rivero, F.; Escrivá, F.; Alvarez, C.; Martín, M.A.** Regulation of endocrine factors by nutrients during the fetal period in mammals. *Current Trends in experimental endocrinology* 2: 105-116 (1994).
 - **Pascual-Leone, A.M.** Investigaciones encaminadas a la prevención de alteraciones adquiridas del desarrollo. *Memoria de la labor de investigación galardonada con la dotación para España de los Premios Reina Sofía, 1994.*
 - **Pedersen, S.** The pregnant diabetic and her newborn. *Munksgaard, Copenhagen, 1977.*
 - **Penicaud, L.; Ferré, P.; Kandé, J.; Leturque, A.; Issad, T.; Girard, J.** Effect of anesthesia on glucose production and utilization in rats. *Am. J. Physiol.* 252:

E365-E369 (1987).

- **Permutt, M.A.; Kipnis, D.M.** Insulin biosynthesis. On the mechanism of glucose stimulation. *Journal of Biological Chemistry* 247:1194-1199 (1972).
- **Phipps, K.; Barker, D.J.P.; Hales, C.N.; Fall, C.H.D.; Osmond, C.; Clark, P.M.S.** Fetal growth and impaired glucose tolerance in men and women. *Diabetologia* 36: 225-228 (1993).
- **Pilistine, S.J.; Moses, A.C.; Munro, H.N.** Placental lactogen administration reserves the effect of low-protein diet on maternal and fetal serum somatomedin levels in pregnant rat. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5853 (1984).
- **Pipeleers, D.G.; Pipeleers-Marichal, M.A.** A method for the purification of single A, B and D cells and for the isolation of coupled cells from isolated rat islets. *Diabetologia* 20: 654-663 (1981).
- **Platt, B.S.; Stewart, R.J.C.** Experimental protein-calorie deficiency: histopathological changes in the endocrine glands of pigs. *J. Endocrinol* 38: 121-143 (1967).
- **Pond, W.G.; Mersmann, H.J.** Severe restriction of dietary protein or total feed during gestation in rats: effects of progeny during postnatal life. *Nutr. Reports Internat.* 37: 1167-1177 (1988).
- **Portha, B.** Development of the pancreatic β -cells: growth pattern and functional maturation. En: *Endocrine and Biochemical Development of the Fetus and Neonate*. Pgs.: 33-43. Eds.: J.M. Cuezva , A.M. Pascual-Leone, M.S. Patel. Plenum Press, New York, 1990.
- **Portha, B.; Giroix, M.H.; Serradas. P.** Insulin production and glucose metabolism in isolated pancreatic islets of rats with NIDDM. *Diabetes* 37: 1226-1233 (1988).

- **Portha, B.** Growth Pattern of Pancreatic beta cells. *Front. Horm. Research* 16:102-110 (1987).
- **Portha, B.; Levacher, C.; Picon, L.; Rosselin, G.** Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes* 23: 889 (1974).
- **Prewitt, T.E.; D'Ercole, A.J.; Switzer, B.R.; Van Wyk, J.J.** Relationship of serum immunoreactive somatomedin-C to dietary protein and energy in growing rats. *J. Nutr.* 112: 144-150 (1982).
- **Rao, K.S.J.** Endocrines in protein-energy malnutrition. *World Rev. Nutr. Diet* 39:53-84 (1982).
- **Rao, R.H.** Diabetes in the undernourished: coincidence or consequence? *Endocrine Rev.* 9 (1): 67-87 (1988).
- **Rasschaert, J.; Reusens, B.; Dahri, S.; Sener, A.; Remacle, C.; Hoet, J.J.; Malaisse, W.** Impaired activity of rat pancreatic islet mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in protein malnutrition. *Endocrinology* 136: 2631-2634 (1995).
- **Rasschaert, J.; Malaisse, W.J.** Hexose metabolism in pancreatic islets. Glucose-induced and calcio dependent activation of FAD-glycerophosphate dehydrogenase. *Biochem J.* 278: 335-340 (1991).
- **Remesar, X.; Arola, L.; Alemany, M.** Malnutrición proteica y alteraciones del metabolismo nitrogenado durante el desarrollo, gestación y lactancia. En: *Bioquímica Perinatal (Aspectos básicos y patológicos)*. pgs. 509-524. Ed.: E. Herrera; Fundación R. Areces, Madrid (1988).
- **Reusens-Billen, B.; Remacle, C.; Daniline, J.; Hoet, J.J.** Cell proliferation in pancreatic islets of rat fetuses and neonates from normal and diabetic mothers. An in vitro and in vivo study. *Horm. Metab. Res.* 11: 565-571 (1984).

- **Richens, C.A.** The innervation of the pancreas. *J. Comp. Neurol.* 83: 223-236 (1945).
- **Rishi, S.; Golob, E.K.; Becker, K.L.; Shah, N.** Pancreatic insulin content of nonpregnant, pregnant and postpartum rats and the developing rat fetus. *Diabetes* 18:268-272 (1969).
- **Rivero, F.** Insulina y nutrientes como moduladores de IGF y sus proteínas ligadoras en el desarrollo de la rata. *Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid, 1994.*
- **Rivero, F.; Goya, L.; Pascual-Leone, A.M.** Comparison of extraction methods for insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) prior to IGF-I measurement in undernourished neonatal rat serum. *Journal of Endocrinology* 140: 257-263 (1994).
- **Rivero, F.; Goya, L.; Aláez, C.; Cacho, J.; Martín, M.A.; Álvarez, C.; Escrivá, F.; Pascual-Leone, A.M.** Effects of undernutrition and diabetes on serum IGF levels during the rat fetal period. *International Symposium: Growth Hormone and IGF-I. 24-26 de Marzo (1993).*
- **Robinson, H.M.; Picou, D.** A comparison of fasting plasma insulin and GH concentrations in marasmic, kwashiorkor, marasmic-kwashiorkor and underweight children. *Pediatr. Res.* 11: 637-640 (1977).
- **Rodrigues, M.A.M.; De Camargo, J.L.V.; Coelho, K.I.R.; Montenegro, H.R.G.; Angeleli, A.Y.O.; Burini, R.C.** Morphometric study of the small intestinal mucosa in young, adult and old rats submitted to protein deficiency and rehabilitation. *Gut* 26: 816-821 (1985).
- **Rodríguez, C.** Alteraciones metabólico-endocrinas en ratas subnutridas desde la etapa fetal. *Tesis Doctoral. F.Farmacia, U.Complutense. Madrid. Junio, 1990.*

- **Rosemberg, L.; Vinik, A.I.** Trophic stimulation of the ductular-islet cell axis: a new approach to the treatment of diabetes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 321: 95-104 (1992).
- **Rutter, W.J.; Pictet, R.L.; Harding, J.D.; Chirgwin, J.M.; Mc Donald, R.J. Przybyl, A.E.** An analysis of pancreatic development: role of mesenchymal factor and other extracellular factors. *Symp. Soc. Dev. Biol.* 35:205-207 (1978).
- **Sampson, D.A.; Jansen, G.R.** Protein and energy nutrition during lactation. *Ann. Rev. Nutr.* 4: 43-67 (1984).
- **Sener, A.; Malaisse-Lagae, F.; Malaisse, W.J.** Decreased activity of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in islets of rats fed a low protein diet. *Med. Sci. Res* 21: 625-626 (1993).
- **Sener, A.; Malaisse, W.J.** Hexose metabolism in pancreatic islets. Calcium-dependent activation of the glycerol phosphate shuttle by nutrient secretagogues. *J. Biol. Chem.* 267: 13251-13256 (1992).
- **Sener, A.; Malaisse W.J.** Nutrient metabolism in islet cell. *Experientia* 40:1026-1035 (1984).
- **Smith, F.E.; Rosen, K.M.; Ville-Komeroff, L.; Weir, G.C.; Bonner-Weir, S.** Enhanced insulin like growth factor I gene expression in the regenerating rat pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6152-6156 (1991).
- **Snoeck, A.; Remacle, C.; Reusens, B.; Hoet, J.J.** Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol. Neonate* 57: 107-118 (1990).
- **Sorenson, R.L.; Brelje, T.C.; Roth, C.** Effects of steroid and lactogenic hormones on islet of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology* 133: 2277-2234

- (1993).
- **Sorenson, R.L.; Parsons, J.A.** Insulin secretion in mammosomatotropic tumor-bearing and pregnant rats: a role for lactogones. *Diabetes* 34: 337-341 (1985).
 - **Straus, D.S.; Ooi, G.T.; Orlowski, C.C.; Rechler, M.M.** Expression of the genes for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II and IGF-Binding proteins 1 and 2 in fetal rat under conditions of intrauterine growth retardation caused by maternal fasting. *Endocrinology* 128:518-525 (1991).
 - **Svenningsen, A.; Bonnerie-Nielsen, V.** Effects of fasting on β -cell function, body fat, islet volume and total pancreatic insulin content. *Metabolism* 33:7 612-616 (1984).
 - **Swenne, I.** Pancreatic β -cell growth and diabetes mellitus. *Diabetol.* 35: 193-201 (1992).
 - **Swenne, I.; Borg, L.A.H.; Crace, C.I.; Schnell Landström, A.** Persistent reduction of pancreatic β -cell mass after a limited period of protein-energy malnutrition in the young rat. *Diabetologia* 35: 939-945 (1992).
 - **Swenne, I.; Borg, L.A.H.; Crace, C.J.; Schnell Landström, A.H.** Persistent reduction of pancreatic β -cell mass after temporary protein-calorie malnutrition in the rat. *Diabetologia* 33 (suppl.) : A110 (1990).
 - **Swenne, I.; Crace, C.J.; Jansson, L.** Intermittent protein-calorie malnutrition in the young rat causes long-term impairment of the insulin secretory response to glucose in vitro. *J. Endocrinol.* 118: 295-302 (1988).
 - **Swenne, I.; Crace, C.J.; Milner, R.D.G.** Persistent impairment of insulin secretory response to glucose in adult rats after limited period of protein-calorie malnutrition early in life. *Diabetes* 36: 454-458 (1987).
 - **Swenne, I.** Glucose-stimulated DNA replication of the islets during development

- of the rat fetus. Effects of nutrients, growth hormone and triiodothyronine. *Diabetes* 34: 803-807 (1985).
- **Swenne, I.** role of glucose in the in vitro regulation of cell cycle kinetics and proliferation in fetal pancreatic B-cells. *Diabetes* 31: 754 (1982).
 - **Tal, M.; Thorens, B.; Surane, M.; Fleischer, N.; Lodish, H.F.; Hanahan, D.; Efrat, S.** Glucose transporter isotypes switch in T-antigen-transformed pancreatic B cells growing in culture and in mice. *Molecular and cellular biology* 12: 422-431 (1992).
 - **Tal, M.; Liang, Y.; Najafi, H.; Lodish, H.F.; Matschinsky, F.M.** Expression and function of GLUT-1 and GLUT-2 glucose transporter isoforms in cells of cultured rat pancreatic islets. *J. Biolog. Chem.* 267: 17241-17247 (1992).
 - **Thissen, J.P.; Ketelsleger, J.M.; Underwood, L.E.** Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine Reviews* 15:80 (1994).
 - **Thorens, B.** Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high Km facilitated diffusion glucose transporter. *Int. Rev. Cytol.* 137: 209-238 (1992).
 - **Thorens, B.; Wu, Y.J.; Leahy, J.L.; Weir, G.C.** The loss of GLUT-2 expression by glucose-unresponsive B cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment. *J. Clin. Invest.* 90: 77-85 (1992).
 - **Thorens, B.; Weir, G.C.; Leahy, J.L.; Lodish, H.F.; Bonner-Weir, S.** Reduced expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and pancreatic islet cell. *Cell* 55: 281-290 (1990).
 - **Thorens, B.; Weir, G.C.; Leahy, J.L.; Lodish, H.F.; Bonner-Weir, S.** Reduced expression of the liver/beta cell glucose transporter isoform in glucose insensitive pancreatic beta cells of diabetic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6492-6506 (1990).

- **Truswell, S.A.** Malnutrition and carbohydrate and lipid metabolism. In: *The Malnourished Child*. Eds.: R.M. Suskind and L. Lewinter-Suskind. Nestlé Nutrition Workshop Series, vol. 19. Nestec Ltd. Vevey/Raven Press, Ltd., New York (1990).
- **Tsuura, Y.; Ishida, H.; Okade, Y.; Seino, Y.** Impaired glucose sensitivity on ATP-sensitive K⁺ channels of pancreatic B-cells in GK rats, a novel genetic NIDDM model. *Diabetes* 43: 1446-1453 (1993).
- **Unger, R.H.** Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic B-cells. *Science* 251: 1200-1205 (1991).
- **Van Assche, F.A.** Quantitative morphologic and histoenzymatic study of the endocrine pancreas in nonpregnant and pregnant rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 118: 39-41 (1974).
- **Verme, T.B.; Hootman, S.R.** Regulation of pancreatic duct epithelial growth in vitro. *Am. J. Physiol.* 258: G833-G840 (1990).
- **Von Mering, I.; Minkowsky, O.** Diabetes mellitus nach pankreasextirpation. *Zentralblatt Klin Med.* 10: 393-394 (1889).
- **Wachstein, M.; Meisel, E.** Relation of dietary protein levels to pancreatic damage in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 85: 314-317 (1954).
- **Waldhäust, E.; Fasching, P.** Fetal growth and impaired glucose tolerance in men and women. *Diabetologia* 36: 973 (1993).
- **Wang, T.C.; Bonner-Weir, S.; Oates, P.S.** Pancreatic gastrin stimulates islet differentiation of the TGF- α induced ductular precursor cells. *J. Clin. Invest.* 92: 1349-1356 (1993).
- **Weinkowe, C.; Weinkowe, E.A.; Timme, A.; Pimstone, B.** Pancreatic islets of malnourished rats. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 101: 266-270 (1977).
- **Weinkowe, C.; Weinkowe, E.A.; Pimstone, B.L.** Glucose tolerance and insulin

- release in malnourished rats. *Cin. Science and Mol. Med.* 50: 153-163 (1976).
- **Wertheimer, E.; Sasson, S.; Cesari, E.; Ben-Neriach, Y.** The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belong to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2525-2529 (1991).
 - **West, K.M.; Kalbfleisch, J.M.** Influence of nutritional factors on prevalence of diabetes. *Diabetes* 20:99 (1971).
 - **W.H.O. Study Group.** Diabetes Mellitus. In: *World Health Org. Tech. Rep. Ser.* Geneva, 1985.
 - **Wunderlich, S.M.; Balige, B.S.; Munro, H.N.** Rat placental protein synthesis and peptide hormone secretion in relation to malnutrition from protein deficiency and alcohol administration. *Journal Nutr.* 109: 1534-1541 (1979).
 - **Yallow, R.S.; Berson, S.A.** The immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39: 1157-1175 (1960).
 - **Yasuda, K.; Yamada, Y.; Inagaki, N.; Yano, H.; Okamoto, Y.; Tsuji, K.; Fukumoto, H.; Imura, H.; Seino, S.; Seino, Y.** Expression of GLUT-1 and GLUT-2 glucose transporter isoforms in rat islets of langerhans and their regulation by glucose. *Diabetes* 41: 76-81 (1992).
 - **Yeh, Y.Y.; Zee, P.; Owen, G.L.; Walker, E.** Effect of postnatal undernutrition on ketone metabolism and its relation to metabolic changes in brain and liver of rats. *J. Nutr.* 112: 1162-1168 (1982).
 - **Younoszai, R.; Dixit, P.K.** Decreased insulin secretion by isolated pancreatic islets from rats fed 4% protein diet. *Proc. Soc. Biol. Med.* 164: 317-321 (1980).